Regulation der Leucinsynthese und Trifluorleucin-resistenz bei Hydrogenomonas H 16

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

FRANK F. HILL

aus Königsberg i. Pr.

Göttingen 1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0025

Regulation der Leucinsynthese und Trifluorleucin-resistenz bei Hydrogenomonas H 16

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

FRANK F. HILL

aus Königsberg i. Pr.

Göttingen 1968

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV. LEIDEN BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H.G. Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. A. Trebst

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.1968

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Experimente und Ergebnisse	4
1. Der Einfluß von Aminosäureantimetaboliten auf Hydrogenomonas	4
1.1. Die Wirksamkeit verschiedener Antimetabolite	4
1.2. Das Wachstum von Hydrogenomonas nach Zusatz eines Antimetaboliten	4
1.3. Die Wirkung von Trifluorleucin auf den Einbau von ^{14}C-U-Leucin in H 16	8
1.4. Bestimmung der bacteriostatischen Konzentration und die Bestimmung der biologischen Antagonisten	10
2. Antimetabolit-resistente Mutanten	11
2.1. Die Isolierung antimetabolit-resistenter Mutanten	11
2.2. Die Aminosäureausscheidung durch antimetabolit-resistente Mutanten	12
2.2.1. Der Nachweis der Aminosäureausscheidung bei Mutanten	12
2.2.2. Der chromatographische Nachweis des Leucins als Ausscheidungsprodukt der Mutante TFL^r S 14	15
2.2.3 Mikrobiologische Identifizierung der durch die Mutante TFL^r S 14 ausgeschiedenen Aminosäuren	15
2.3. Der Einfluß des Substrates auf die Aminosäureausscheidung durch die Mutante TFL^r S 14	16
2.4. Der Temperatureinfluß auf die Produktbildung	23
2.5. Die Leucin- und Trifluorleucinoxydation durch den Wildtyp H 16 und die Mutante TFL^r S 16	25
3. Die Leucinbiosynthese bei Hydrogenomonas H 16	28
3.1. Die Einordnung von auxotrophen Mutanten in das Biosyntheseschema	28
3.2. Der Nachweis der α-IPM-Synthase bei H 16	30
3.3. Der fluorometrische Nachweis der α-IPM-Synthase	30
3.4. Anreicherung der α-IPM-Synthase in Mutanten von Hydrogenomonas durch spezielle Anzuchtmethoden	35
3.5. Die Bestimmung des K_m-Wertes für α-Keto-isovaleriansäure	37

Seite

3.6. Die Hemmbarkeit der α-IPM-Synthase durch verschiedene Aminosäuren 37

3.7. Die Wirkung strukturanaloger Verbindungen auf die durch L-Leucin gehemmte α-IPM-Synthase 40

3.8. Vergleichsuntersuchungen zur Reaktivierung der durch L-Leucin gehemmten α-IPM-Synthase durch L-Valin bei anderen Bakterien 41

3.9. Die Abhängigkeit der Hemmung der α-IPM-Synthase von der Inhibitorkonzentration 43

3.10. Die Abhängigkeit der Hemmbarkeit der α-IPM-Synthase vom pH-Wert 44

3.11. Die unspezifische Reaktion der α-IPM-Synthase mit α-Ketosäuren 47

3.12. Die Regulation der Bildung der α-IPM-Synthase 50

3.13. Die Transaminierung von Leucin, Valin, Isoleucin und Trifluorleucin 51

4. Die Charakterisierung von trifluorleucin-resistenten Mutanten bei Hydrogenomonas H 16 53

4.1. Mutanten mit dereprimierter AHS-Synthase 53

4.2. Die Stabilität von Mutanten mit dereprimierter AHS-Synthase 55

4.3. Trifluorleucin-resistente Mutanten mit veränderter Acetohydroxysäure-Synthase 59

4.4. Die Isolation von Revertanten mit veränderter AHS-Synthase 60

4.5. Trifluorleucin-resistente Mutanten mit veränderter Regulation der Leucinbiosynthese 63

5. Die Aminosäureausscheidung durch die Mutante vi⁻ 43 65

5.1. Die Leucinausscheidung durch die Mutante vi⁻ 43 65

5.2. Die Ausscheidung von ^{14}C-markiertem Leucin 66

5.3. Die Verteilung der Radioaktivität im Leucin 71

5.4. Nachweis der Ausscheidung von radioaktiv markierten Säuren 73

5.5. Die Ausscheidung von Leucin durch den Wildtyp Hydrogenomonas H 16 75

5.6. Die Ausscheidung von α-Aminobuttersäure durch die Mutante H 16 vi⁻ 43 76

5.7. Die Bildung von Norvalin aus α-Aminobuttersäure durch die Mutante H 16 vi⁻ 43 77

Seite

5.8. Die Bildung von Norleucin aus Norvalin durch die Mutante H 16 vi⁻ 43 79

Diskussion 81

Zusammenfassung 95

Methoden 98

Literaturverzeichnis 114

Verwendete Abkürzungen:

AHS-	Acetohydroxysäure-
ATP	Adenosin-5'-triphosphorsäure
-CoA	verestertes Coenzym A
CoA SH	freies Coenzym A
DNS	Desoxyribonucleinsäure
E	Enzymeinheit (µmol/min)
E_{nm}	Extinktion
IPM	Isopropyläpfelsäure
Ipm	Impulse pro Minute
K-i-val	Ketoisovaleriansäure
NAD^+	Nicotinamidadenindinucleotid (oxydiert)
NMG	1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin
t-RNS	transfer-Ribonucleinsäure
TCE	Trichloressigsäure
TFL	5',5',5'-Trifluorleucin
TG	Zelltrockengewicht

EINLEITUNG

Die ökonomische Regelung des Stoffwechsels in der Zelle verhindert normalerweise die Überproduktion von Intermediären und Bausteinen für die Polymerensynthese. Die beiden Mechanismen der Regulation, die Repression und die allosterische Hemmung, sind an zahlreichen Mikroorganismen untersucht worden. In Mutanten, denen diese Mechanismen fehlen, kann der Stoffumsatz in neue Bahnen gelenkt werden. Mutationen im Regulationssystem führen häufig zur Ausscheidung von Stoffwechselprodukten in die Nährlösung, die vom Wildtyp nicht ausgeschieden werden.

Für die gezielte Selektion von ausscheidenden Mutanten hat der Einsatz von Antimetaboliten große Bedeutung erlangt. Die Antimetabolit-Technik beruht darauf, daß sich auch höchstspezifisch wirkende Enzymproteine durch Strukturanaloge der normalen Metaboliten täuschen lassen. Auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit den Substraten werden sie an deren Stelle in die Zelle aufgenommen und in den Stoffwechsel eingeschleust. Die Antimetabolite erfüllen zwar einige, aber nicht alle Funktionen der normalen Metabolite. Ihr Eingriff in den Stoffwechsel führt schließlich zu einer Hemmung des Wachstums.

Strukturanaloge Verbindungen der Proteinaminosäuren sind in großer Zahl synthetisiert worden; sie kommen aber auch als sekundäre Stoffwechselprodukte in Pflanzen und Mikroorganismen vor. Eine Möglichkeit des Eingreifens in den Zellstoffwechsel ist an Stellen gegeben, an denen die natürliche Proteinaminosäure als Substrat oder regulatorischer Effektor reagiert. Solche Angriffspunkte sind die Aufnahme in die Zelle, die Endproduktheminung, die Repression und der Einbau in das Protein. Das Eingreifen des Strukturanalogen einer Proteinaminosäure an einer oder mehreren dieser Stellen kann das Wachstum einer Zelle unterbinden. Umgekehrt setzt die bacterio- oder cytostatische Wirkung die Reaktion an einer der erwähnten Stellen voraus.

In einer Bakterienpopulation treten häufig Mutanten auf, deren Toleranz gegenüber dem Antimetaboliten höher ist als bei den Wildtypzellen. Bei einer gegebenen Antimetabolitkonzentration erscheinen diese Mutanten resistent; sie wachsen auch in Gegenwart des Antimetaboliten. Mutanten, deren Resistenz auf einem Defekt der Regulation in der Metabolitensynthese beruht, sind von besonderem Interesse. Der phänotypische Ausdruck einer solchen Mutation ist die Überproduktion von Metaboliten, die angehäuft und oft ausgeschieden werden. Zur gezielten Selektion regulationsdefekter Mutanten ist die Antimetabolit-Technik erstmals von ADELBERG (1958) angewandt worden.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Regulation der Biosynthese des Leucins bei Hydrogenomonas H 16. Die Ergebnisse gründen sich auf Untersuchungen von intakten Zellen und von zellfreien Extrakten regulationsdefekter Mutanten, von denen die meisten nach der Antimetabolit-Technik isoliert wurden.

Der Biosyntheseweg des Leucins steht in enger Beziehung zu dem des Valins. Letzterer ist ein Parallelweg der Isoleucinsynthese. Zur Erleichterung des Verständnisses der verwendeten Bezeichnungen ist in Abb. 1 ein Schema der Biosynthese dieser drei Aminosäuren wiedergegeben.

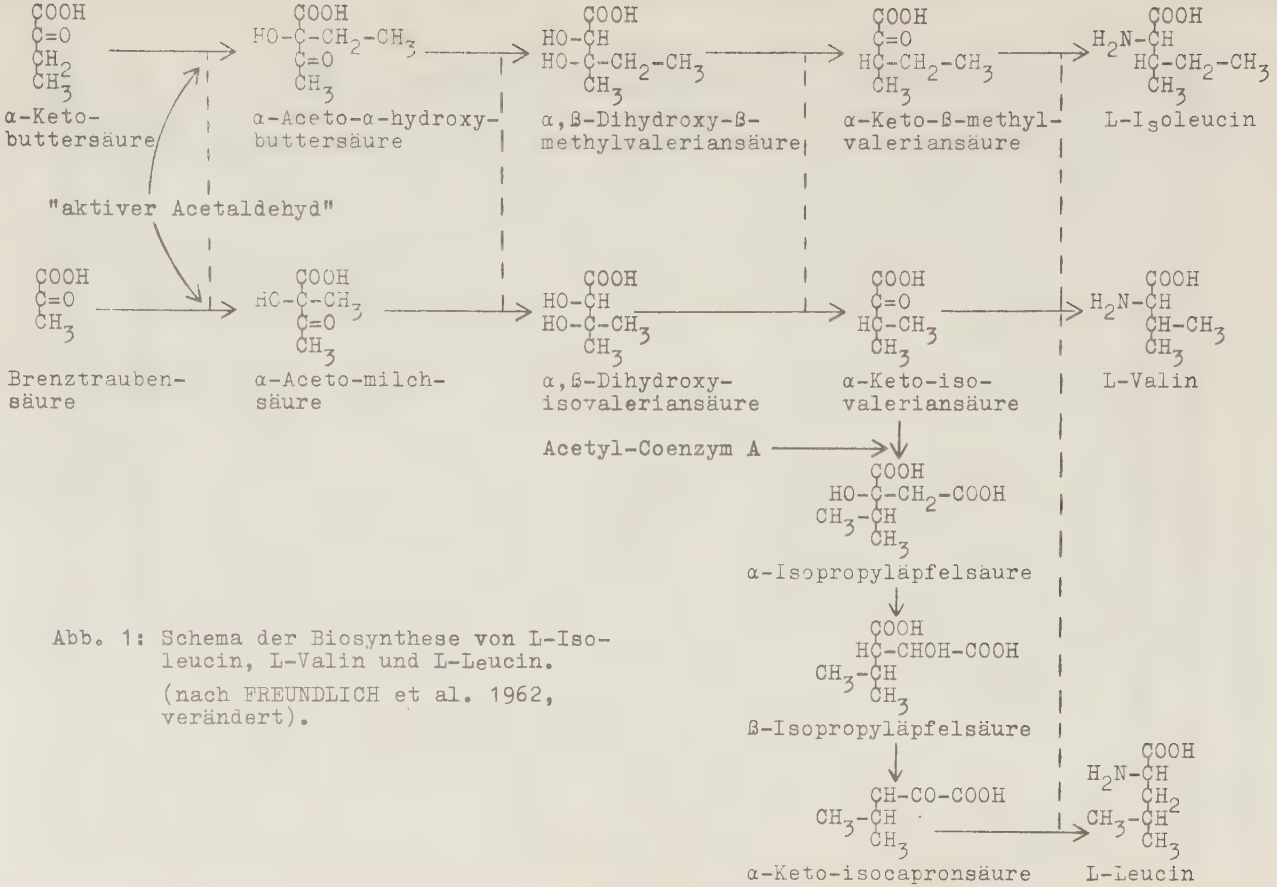


Abb. 1: Schema der Biosynthese von L-Isoleucin, L-Valin und L-Leucin.
(nach FREUNDLICH et al. 1962, verändert).

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

1. Der Einfluß von Aminosäureantimetaboliten auf Hydrogenomonas

1.1. Die Wirksamkeit verschiedener Antimetabolite

Das Eingreifen von strukturanalogen Verbindungen der Proteinaminosäuren in den Zellstoffwechsel ist an einer Hemmung des Wachstums erkennbar. Um die bacteriostatische Wirkung verschiedener Aminosäureantagonisten auf Hydrogenomonas H 16 zu prüfen, wurden auf Fructose-Mineralagarplatten, die in 10^{-3}M Konzentration den jeweiligen Antimetaboliten enthielten, 10^{8} Zellen des Wildtyps ausgespatelt. Hatte sich nach einer Woche ein geschlossener Bakterienrasen gebildet, so war der Wildtyp gegen den betreffenden Antimetaboliten unempfindlich. Dabei wurden Antimetabolite, an die sich der Wildtyp phänotypisch adaptieren konnte, als unwirksam erfaßt. Waren keine oder nur einzelne Kolonien auf der betreffenden Platte vorhanden, so war der Antimetabolit wirksam. Die Einzelkolonien wurden durch die in jeder Bakterienpopulation vorhandenen, genotypisch resistenten Mutanten gebildet. Die Wirksamkeit von zwölf geprüften Antimetaboliten ist in der Tab. 1 wiedergegeben.

Hydrogenomonas war gegen alle geprüften strukturanalogen Verbindungen der Proteinaminosäuren empfindlich, mit Ausnahme von Norvalin und Cycloleucin (= 1-Aminocyclopentan-1-carbonsäure), die selbst in 10^{-2}M Konzentration nicht bacteriostatisch wirkten. Die kompetetive Hemmung des Wachstums durch den Antimetaboliten konnte durch das Auflegen eines präparierten Filterpapierblättchens auf die Platten nachgewiesen werden. Das Papier war mit einer 10^{-2}M Lösung des natürlichen Metaboliten getränkt, sterilisiert und getrocknet worden. Auf Antimetabolit-Agarplatten bildete der Wildtyp um das Blättchen mit dem Metaboliten eine deutliche Wachstumszone aus.

1.2. Das Wachstum von Hydrogenomonas nach Zusatz eines Antimetaboliten

Das Wachstum von Bakterien kann durch den Zusatz eines Antime-

Tab. 1: Wirksamkeit von Aminosäureantimetaboliten auf Hydrogenomonas

Antimetabolit	Metabolit	bereits an anderen Organismen geprüft durch	A	B
DL-Äthionin	Methionin	Adelberg (1958)	+	+
L-S-(ß-Aminoäthyl)cystein	Lysin	Shiota et al. (1958)	+	+
1-Aminocyclopentan-1-carbonsäure	Leucin	Brown (1967)	-	
L-Canavanin	Arginin	Maas (1961)	+	+
DL-p-Chlorphenylalanin	Phenylalanin	Mitchell und Niemann (1947)	+	+
DL-p-Fluorphenylalanin	Phenylalanin	Munier und Cohen (1956)	+	+
DL-5-Methyltryptophan	Tryptophan	Moyed (1960a)	+	+
DL-Norleucin	Methionin	Harding und Shive (1948)	+	++
DL-Norvalin	Leucin	Dittmer (1950)	-	
DL-Thiazolidin-4-carbonsäure	Prolin	Unger und DeMoss (1966)	+	-
DL-ß-2-Thienylalanin	Phenylalanin	Dunn et al. (1956)	+	+
DL-5',5',5'-Trifluorleucin	Leucin	Loncrini (1956)	+	+

A) Hemmung der Koloniebildung des Wildtyps
B) Einzelkolonien spontaner Resistenzmutanten

taboliten in charakteristischer Weise verändert werden. Aus der Veränderung können Rückschlüsse auf die Art des Eingreifens gezogen werden (RICHMOND, 1962). Nach der Zugabe eines Antimetaboliten zu einer logarithmisch wachsenden Bakteriensuspension wurden hauptsächlich zwei verschiedene Wachstumskurven beobachtet. Die eine ist durch die lineare Zunahme der Trübung gekennzeichnet, die andere durch ein schnelles Abknicken und völligen Stillstand der Trübungszunahme innerhalb kurzer Zeit. Lineares Wachstum wurde bei Escherichia coli nach Zusatz von 5-Methyltryptophan, p-Fluorphenylalanin, ß-2-Thienylalanin und Norleucin gefunden. Die Extinktion nahm innerhalb von 5 Std. auf das Drei- bis Vierfache zu, danach kam das Wachstum völlig zum Erliegen (COHEN UND MUNIER 1959, MUNIER UND COHEN 1956, 1959). Dagegen verursachte p-Fluorphenylalanin bei Bacillus cereus erst nach 20 min eine Veränderung im Verlauf des Wachstums, dann trat eine schnelle, vollständige Hemmung ein (RICHMOND 1960).

Das lineare Wachstum ist charakteristisch für Antimetabolite mit ausgeprägter Repressionswirkung. Die Bildung von bestimmten Enzymen wird verhindert und dadurch das Wachstum einer Bakteriensuspension durch die Synthese des Metaboliten begrenzt. Dagegen ist die rasche, vollständige Wachstumshemmung, die innerhalb einer Generationszeit eintritt, ein Hinweis, daß der Antimetabolit direkt die Neusynthese des Metaboliten verhindert (RICHMOND 1962).

Bei H 16 wurde der Einfluß von Trifluorleucin auf das Wachstum untersucht. Dazu wurden Zellen in Röhrchen angezogen, dann mit dem Antimetaboliten bzw. zu einem späteren Zeitpunkt mit einem Überschuß des Metaboliten versetzt. Um die Extinktionen nicht durch zugesetzte Lösungen zu verändern, wurden die Aminosäuren in fester Form in einem getrennten Röhrchen sterilisiert. Die Bakteriensuspension wurde zu dem entsprechenden Zeitpunkt in das neue Kulturröhrchen übergeführt.

Wenn Trifluorleucin den wachsenden Zellen in 10^{-3}M Konzentration verabreicht wurde, kam das Wachstum innerhalb von 3 Std. völlig

zum Stillstand. In dieser Zeit verdoppelte sich die Trübung der Suspension. Wurde nach 23 Std. zu dem Ansatz ein fünffacher Überschuß des Metaboliten (5×10^{-3}M L-Leucin) zugesetzt, so nahm die Extinktion nach einer kurzen Anlaufphase wieder zu (Abb. 2).

Der Versuch zeigte, daß Trifluorleucin bacteriostatisch auf Wildtypzellen von H 16 wirkte. Aus der Trübungskinetik konnte nach RICHMOND (1962) entnommen werden, daß durch Trifluorleucin die Neusynthese des Leucins verhindert wurde. In wenig mehr als einer Generationszeit, führte Trifluorleucin zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums.

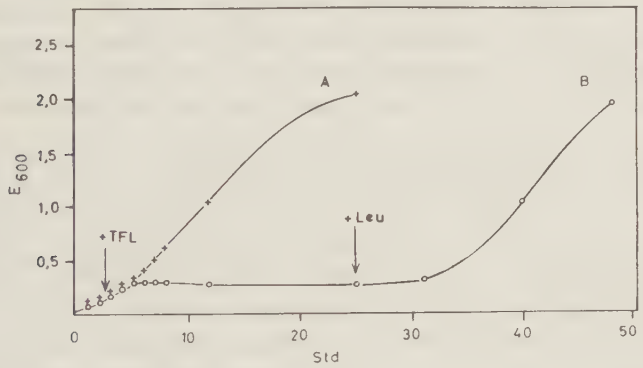


Abb. 2: Das Wachstum von Hydrogenomonas H 16 mit Trifluorleucin.

Aus einer logarithmisch wachsenden Vorkultur wurden 2,5 ml Bakteriensuspension in Teströhrchen (Bausch & Lomb, 3 x 4" test tube) mit 5 ml frischer Mineral-Fructose-Nährlösung übertragen. Die Ansätze wurden bei 28°C auf einem Kreisschüttler bewegt. Der Ansatz A) enthielt eine Kontrollsuspension, die ohne weitere Zusätze inkubiert wurde. Der Ansatz B) wurde nach 3 Std. (Pfeil) in ein steriles Röhrchen mit 2,7 mg DL-Trifluorleucin übergeführt. Nach 25 Std. wurde der Ansatz in ein Röhrchen übertragen, das 9,9 mg L-Leucin enthielt. Die Extinktion beider Ansätze wurde im Photometer (Bausch & Lomb, Spectronic 20) bei 600 nm gemessen.

1.3. Die Wirkung von Trifluorleucin auf den Einbau von ^{14}C-U-Leucin in H 16.

Auf Grund bekannter Untersuchungen über die Trifluorleucinwirkung konnte angenommen werden, daß der Antimetabolit in verschiedene Reaktionen des Stoffwechsels eingreifen kann. Bei Salmonella typhimurium wirkt TFL als negativer allosterischer Effektor der Leucinbiosynthese (UMBARGER et al. 1965) und bei Escherichia coli ließ sich Trifluorleucin in Proteinhydrolysaten nachweisen (RENNERT und ANKER 1963).

Bei Hydrogenomonas H 16 dominierte im Wachstumsversuch die Wirkung des Trifluorleucins als Hemmstoff der Leucinsynthese. Nach der Aktivierung des Antimetaboliten wären weitere Wirkungsmöglichkeiten gegeben; entweder durch eine "falsche" Repression, oder durch die Bildung inaktiver Enzymproteine nach Einbau des Antimetaboliten. Vor die Aktivierung von Aminosäuren zur Aminocyl-t-RNS ist ein hochspezifischer Erkennungsvorgang durch die Aminoacyl-t-RNS-Synthetase geschaltet. Wegen der Spezifität dieser Enzyme, sowohl für die Aminosäure als auch für die t-RNS, wurden sie als "Genies unter den Enzymen" bezeichnet (PETERSON 1967). Konkurriert ein Antimetabolit auf Grund seiner hohen Isosterie (DITTMER 1950) mit der Proteinaminosäure um die Bindung an das Enzym, müßte der Einbau des Metaboliten in das Zellprotein verringert werden. Die Folgen einer weiteren Aktivierung des Antimetaboliten mit der Bindung an die entsprechende t-RNS, die Repression und die Bildung inaktiver Enzymproteine, können experimentell nur schwer unterschieden werden.

Es wurde untersucht, ob Trifluorleucin einen Einfluß auf den Einbau des Leucins in Hydrogenomonas H 16 hat. Als Meßgröße für den Einbau des Metaboliten wurde die Zunahme der Radioaktivität im Zellprotein während des Wachstums der Zellen in einer ^{14}C-U-Leucin und Trifluorleucin enthaltenden Nährlösung bestimmt.

Das Ergebnis zeigte, daß eine kompetetive Hemmung des Leucineinbaues durch Trifluorleucin vorlag (Abb. 3). Der Einbau des

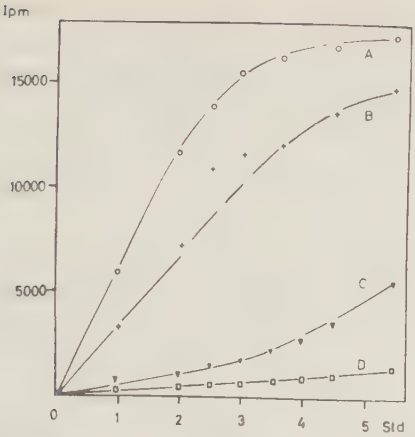


Abb. 3: Die Hemmung des ^{14}C-U-Leucineinbaues bei Hydrogenomonas durch Trifluorleucin.

Logarithmisch wachsende Zellen des Wildtyps wurden durch Zentrifugation geerntet, einmal mit Fructose-Mineral-Nährlösung gewaschen und in frischer Nährlösung resuspendiert. Es wurden folgende Ansätze gemacht: Zu jeweils 10 ml Bakteriensuspension mit 1 mM ^{14}C-U-Leucin (spez. Aktivität 2,6 x 10^5 Ipm /µmol) wurde DL-Trifluorleucin in den angegebenen Endkonzentrationen gegeben.

Ansatz A enthielt kein Trifluorleucin
" B " 2 mM "
" C " 4 mM "
" D " 8 mM "

Die Ansätze wurden bei 30°C in einem Wasserbad geschüttelt. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben (1 ml) entnommen. Die Bakterienzellen wurden auf Membranfiltern abgesaugt (Sartorius Membranfilter, MF 14, 35 mm Ø). Die Zellen wurden einmal mit 0,5 M TCE und zweimal mit 5 ml Wasser gewaschen. Nachdem die Filter über Nacht an der Luft getrocknet worden waren, wurden sie zerschnitten und die Radioaktivität in Toluol-Scintillationslösung gemessen.

Metaboliten war dem Verhältnis Metabolit : Antimetabolit proportional. Nach 3 1/2 Std. Inkubationszeit war der Einbau von ^{14}C-U-Leucin durch eine äquimolare Menge Trifluorleucin um 27 %, gegenüber einer Kontrolle ohne Trifluorleucin, verringert worden. Bei einem Verhältnis von Leucin : Trifluorleucin von 1 : 2 wurde der Einbau um 77 %, bei einem Verhältnis von 1 : 4, um 94 % verringert.

Das Ergebnis kann auch durch eine gleichzeitige Hemmung der Aufnahme des Leucins in die Zelle beeinflußt werden, jedoch dürfte sich diese Wirkung erst bei hohen Antimetabolitüberschüssen störend bemerkbar machen. Die Tatsache, daß schon bei gleicher Menge zugesetztem L-Leucin und L-Trifluorleucin eine kräftige Hemmung des Leucineinbaues vorhanden ist, kann wahrscheinlich als Konkurrenz um dasselbe aktivierende Enzym gedeutet werden. Zusammen mit der Hemmung der Leucinsynthese (1.2) zeigt der Versuch, daß Trifluorleucin eine breite Wirkung auf H 16 hat.

1.4. Bestimmung der bacteriostatischen Konzentration und die Bestimmung der biologischen Antagonisten

Für die Isolierung von resistenten Mutanten war es wichtig, die Empfindlichkeit des Wildtyps gegen Trifluorleucin zu bestimmen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe des Antimetaboliten in Fructose-Mineral-Nährlösung hergestellt. Reagenzröhrchen, die 7 ml der Nährlösung enthielten, wurden mit einer Impföse gut gewachsener Zellsuspension von H 16 angeimpft. Die Ansätze wurden bei 28°C auf einem Kreisschüttler bewegt.

Der Wildtyp war in der Lage, sich nach einer lag-Phase an eine 10^{-5}M Konzentration des Antimetaboliten zu adaptieren. Konzentrationen ab 5 x 10^{-5}M unterdrückten das Wachstum völlig, d.h. daß 0,09 mg / ml DL-Trifluorleucin das Wachstum von ca. 10^{8} Zellen / ml vollständig hemmten.

Die Wirksamkeit von möglichen biologischen Antagonisten des Trifluorleucins wurde auf Agarplatten geprüft. Auf Fructose-Mineral-Agarplatten, die in 10^{-3}M Konzentration den Antimetaboliten

enthielten, wurden 10^7 Zellen des Wildtyps ausgespatelt. Mit einem sterilen Korkbohrer wurde ein Loch in das Zentrum jeder Agarplatte gestanzt, in das 2 Tropfen einer 10^{-2}M Lösung der zu prüfenden Substanz gegeben wurden. Die Platten wurden drei Tage bei 28°C bebrütet.

Um zugesetztes L-Leucin und um K-α-Ketoisocaproat war der Wildtyp in einer großen Zone gewachsen. Beide Substanzen waren als biologische Antagonisten des Trifluorleucins wirksam. DL-Isoleucin, DL-Valin, DL-Valin + DL-Isoleucin + Ca-pantothenat, D-Leucin und K-isovalerat förderten das Wachstum des Wildtyps nicht.

2. Antimetabolit-resistente Mutanten

2.1. Die Isolierung antimetabolit-resistenter Mutanten

Mutanten, die gegen Gifte, Antibiotika, Antimetabolite und Bacteriophagen resistent sind, lassen sich leicht isolieren. In einem Ansatz, in dem das Wachstum des Wildtyps durch den Zusatz des betreffenden Hemmstoffes unterbunden wird, vermögen nur resistente Mutanten zu wachsen. Aus den Anreicherungskulturen können nach den üblichen Verfahren reine resistente Stämme isoliert werden.

Für antimetabolit-resistente Mutanten ist dabei von besonderer Bedeutung, daß verschiedentlich Mutanten erhalten wurden, die den natürlichen Metaboliten aus der Zelle ausschieden. Das erste bekannt gewordene Beispiel war die Isolierung von sulfonamid-resistenten Mutanten bei Staphylococcus aureus, die erhöhte Mengen p-Aminobenzoesäure bildeten (LANDY et al. 1943, OAKBERG und LURIA 1947). SCHERR und RAFELSON (1962, 1963 a) nutzten die Antimetabolittechnik für ein Verfahren zur erhöhten Metabolitproduktion aus. Die direkte Isolierung von ausscheidenden Mutanten durch die Antimetabolittechnik wurde von ADELBERG(1958) beschrieben. Er beobachtete, daß auf antimetabolit-haltigen Agarplatten, auf denen 10^8 Zellen von Escherichia coli ausgespatelt worden waren, um einige Kolonien resistenter Mutanten Mikrokolonien des Wildtyps wuchsen. Da die Hemmwirkung des Antimetaboliten kompetetiv durch den natürlichen Metaboliten aufgehoben wurde, war die Bildung der

Satelliten-Kolonien des Wildtyps ein direkter Hinweis, daß durch die zentrale Kolonie der resistenten Mutante der betreffende Metabolit ausgeschieden wurde.

Bei Hydrogenomonas H 16 wurden verschiedene resistente Mutanten durch das Ausspateln von 10^7 mutagenisierten Wildtypzellen auf antimetabolit-haltigen Agarplatten isoliert. Es wurden insbesondere satellitenbildende resistente Kolonien abgeimpft, durch Ausstrich auf Nutrient-broth Agarplatten gereinigt und auf die Stabilität der Resistenzeigenschaft geprüft.

Im Modellversuch zeigt die Abb. 4 die Bildung von Satellitenkolonien des Wildtyps um eine antimetabolit-resistente Kolonie. Der im Agar enthaltene Antimetabolit (DL-Äthionin, 10^{-3}M) verhinderte das Wachstum des auf die Platte gesprühten Wildtyps H 16. U_m die resistente Kolonie der Mutante $Äth^r$ S 47 bildeten sich aber ebenso wie um ein Papierblättchen, das den Metaboliten (L-Methionin) enthielt, Mikrokolonien des Wildtyps.

2.2. Die Aminosäureausscheidung durch antimetabolit-resistente Mutanten

2.2.1. Der Nachweis der Aminosäureausscheidung bei Mutanten

Die Ausscheidungsprodukte von drei verschiedenen antimetabolit-resistenten Mutanten wurden dünnschichtchromatographisch identifiziert. Dazu wurden die Mutanten in einer Fructose-Mineral-Nährlösung angezogen und durch Zentrifugation geerntet. Die ausgeschiedenen Aminosäuren wurden im klaren Nährlösungsüberstand nach der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Im Überstand einer äthionin-resistenten Mutante konnte Methionin bei einer S-(ß-aminoäthyl)cystein-resistenten Mutante, Homoserin und Lysin und bei einer trifluorleucin-resistenten Mutante Valin und Leucin (Isoleucin) identifiziert werden.

Abb. 4: Satellitenbildung durch eine äthionin-resistente Mutante.

Auf Fructose-Mineral-Äthionin-Agar, der in 10^{-3}M Konzentration den Antimetaboliten enthielt, wurde die Mutante $Äth^r$ S 47 aufgeimpft (rechts). Die Platte wurde 4 Tage bei 28°C inkubiert. Dann wurde eine Suspension des Wildtyps H 16 (10^7 Zellen / ml in Mineral-Nährlösung) auf die Platte aufgesprüht. Die Suspensionströpfchen wurden von dem oberflächlich getrockneten Agar sofort aufgesogen, so daß ein Verschwimmen der gewachsenen resistenten Kolonie nicht möglich war. Ein Filterpapierblättchen, das mit L-Methionin-Lösung (10^{-2}M) getränkt worden war, wurde auf den Agar aufgelegt (links). Nach 2 Tagen Inkubation bei 28°C wurde die Aufnahme gemacht.

Tab. 2: Die Aminosäureausscheidung durch antimetabolit-resistente Mutanten von H 16.

Resistenz gegen	DL-Äthionin	L-S-(ß-Aminoäthyl)-cystein(=Thialysin)	DL-Trifluorleucin
Mutagenes Agenz.	NMG	spontan	NMG
Bezeichnung der Mutante	$Äth^r$ S 47	$Tlys^r$ S 1	TFL^r S 14
Erhöhung der Toleranzdosis	mindestens 1000fach	mindestens 1000fach	mindestens 1000fach
Ausgeschiedene Aminosäuren (abgeschätzt)	20 µg/ml Methionin (+Glutaminsäure*)	100 µg/ml Homoserin 25 µg/ml Lysin (+ Glutaminsäure*)	100 µg/ml Valin 20 µg/ml Leucin (Isoleucin) (+ Glutaminsäure*)

* wurde nicht bestimmt

Die Mutanten wurden in Fructose-Mineral-Nährlösung angezogen. Nach 48 Std. wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min bei 30 000 g) abgetrennt. 40 ul des klaren Überstandes wurden auf Cellulose-Gips-Dünnschichtplatten aufgetragen. Synthetische Aminosäuren wurden cochromatographiert. Die Menge der Aminosäuren wurde nach der Entwicklung mit dem Ninhydrinreagenz aus der Farbintensität abgeschätzt. Als Laufmittel wurden für die Identifizierung von Valin, Leucin und Isoleucin, Trifluorleucin, Methionin und Äthionin n-Butanol-Eisessig-Wasser (80 T. : 20 T. : 20 T.) und für die Identifizierung von Homoserin, Lysin und S-(ß-Aminoäthyl)cystein, wassergesättigtes Phenol verwendet.

2.2.2. Der chromatographische Nachweis des Leucins als Ausscheidungsprodukt der Mutante TFL^r S 14.

Da das Isomerenpaar Leucin-Isoleucin sich nur schwer trennen läßt, wurden in einem weiteren Versuch die durch die Mutante TFL^r S 14 ausgeschiedenen Aminosäuren identifiziert. Zur dünnschichtchromatographischen Trennung wurde das Laufmittel wassergesättigtes n-Butanol benutzt (RENNERT und ANKER, 1963). Der R_f-Wert des Leucins betrug in diesem System 0,56, der des Isoleucins 0,48. In dem Kulturfiltrat der Mutante TFL^r S 14 konnte dadurch eindeutig Leucin nachgewiesen werden (Abb. 5). Durch die Akkumulation des Valins unterschied sich die Mutante von den bisher isolierten trifluorleucin-resistenten Mutanten bei Salmonella typhimurium (CALVO und UMBARGER 1964, CALVO und CALVO 1967), und Neurospora crassa (WEBSTER und GROSS 1965), die nur Leucin ausschieden.

2.2.3. Mikrobiologische Identifizierung der durch die Mutante TFL^r S 14 ausgeschiedenen Aminosäuren

Empfindlicher als der chromatographische Nachweis von Aminosäuren ist das Wachstum auxotropher Mutanten in Lösungen, die die von ihnen benötigte Aminosäure enthalten. Durch einen Wachstumsversuch, bei dem eine für Valin und Isoleucin auxotrophe Mutante von Hydrogenomonas in das Kulturfiltrat der trifluorleucin-resistenten Mutante geimpft wurde, konnte gezeigt werden, daß neben Valin und Leucin auch Isoleucin bzw. ein Vorläufer des Isoleucins in dem Kulturfiltrat der Mutante TFL^r S 14 vorhanden war (Abb. 6). Ebenso wurde das Wachstum einer leucin-auxotrophen Mutante gefördert.

Die Ausscheidungsprodukte der isolierten trifluorleucin-resistenten Mutante stimmten mit einer von REH (1967) isolierten Mutante von H 16 überein. Diese Mutante akkumulierte Valin, Leucin und Isoleucin in der Nährlösung. Sie war als spontane Revertante eines threonindesaminase-defekten Elternstammes isoliert worden. In enzymatischen Untersuchungen konnte bei der

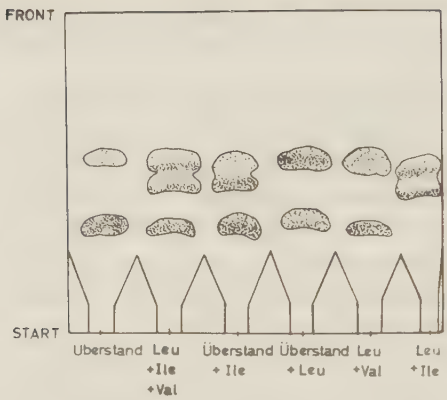


Abb. 5: Die Identifizierung des Leucins im Kulturfiltrat der Mutante TFL^r S 14.

Die Mutante wurde in Ammoniumlaktat-Mineral-Nährlösung angezogen. Nach 48 Std. wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und 40 ul des klaren Überstandes auf Cellulose-Gips, aufsteigend nach der Keilstreifentechnik, dünnschichtchromatographiert. Als Laufmittel wurde wassergesättigtes n-Butanol benutzt. Es wurden jeweils 5 µg der in der Abbildung angegebenen synthetischen Aminosäuren cochromatographiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem Ninhydrinreagenz.

Revertante eine konstitutiv derepremierte Acetohydroxydsäure-Synthase nachgewiesen werden.

Die Mechanismen, die bei beiden Mutanten die Ausscheidung von drei Aminosäuren durch eine Mutation bewirkten, werden an anderer Stelle noch eingehender erörtert (s. Diskussion).

2.3 Der Einfluß des Substrates auf die Aminosäureausscheidung durch die Mutante TFL^r S 14

Die durch Mikroorganismen bewirkten Fermentationen können im zeitlichen Verlauf von Substratverbrauch, Wachstum und Produkt-

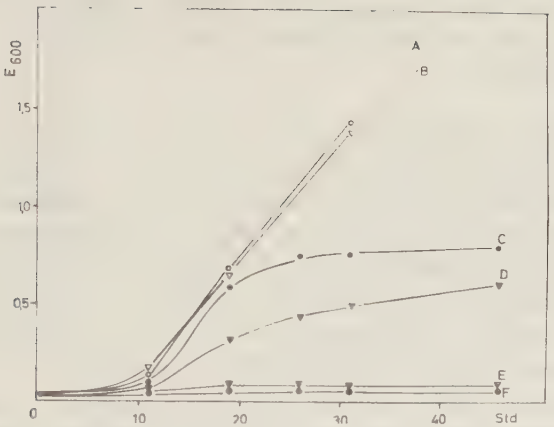


Abb. 6: Die mikrobiologische Identifizierung der durch die Mutante TFL^r S 14 ausgeschiedenen Aminosäuren

Die Mutante TFL^r S 14 wurde in Ammoniumlaktat-Mineral-Nährlösung angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Dann wurden in Teströhrchen (Bausch & Lomb, 3x4" test tube) folgende Ansätze gemacht:

Bezeichnung des Ansatzes	A	C	F	B	D	E
Frisches Nährmedium zugesetzt	7,0 ml	3,5 ml	7,0 ml	7,0 ml	3,5 ml	7,0 ml
Überstand von TFL^r S 14	-	3,5 ml	-	-	3,5 ml	-
Aminosäurezusatz	1 mM L-Leu	-	-	1 mM L-Val L-Ile	-	-
Angeimpft mit	0,5 ml gewaschener Zellsuspension von H 16 leu$^-$ 05			0,5 ml gewaschener Zellsuspension von H 16 vi$^-$ 9		

Die Röhrchen wurden auf einem Kreisschüttler bei 28°C bewegt. Die Trübung der einzelnen Ansätze wurde nach bestimmten Zeiten im Photometer (Bausch &Lomb, Spectronic 20) bei 600 nm gemessen.

bildung stark voneinander abweichen. GADEN (1955, 1959) unterschied drei Fermentationstypen. Im ersten Typ fallen Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung zeitlich zusammen; im zweiten setzen Produktbildung und ein erneuter Substratverbrauch nach Beendigung des Wachstums ein, und im dritten ist die Produktbildung vom Wachstum völlig unabhängig und an keinen wesentlichen Substratumsatz gebunden. Bei der Mutante TFL^r S 14 wurden schwankende Mengen an Ausscheidungsprodukten festgestellt. Der Zeitpunkt des Aberntens und die Art der C-Quelle beeinflußten die Ausbeuten erheblich. Bei den Untersuchungen zum Verlauf der Aminosäureausscheidung wurde berücksichtigt, daß molekularer Wasserstoff von Hydrogenomonas H 16 nicht nur als Energiequelle verwertet werden konnte, sondern auch verschiedene Effekte auf die Verwertung organischer C-Quellen hat (GOTTSCHALK 1965, BLACKKOLB 1968).

Die Produktbildung durch die Mutante TFL^r S 14 wurde in 1,5 l Nährlösungsansätzen, die mit dem jeweiligen organischen Substrat bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % versetzt worden waren, bestimmt. Das Wachstum wurde durch die Proteinbildung und die Aminosäureausscheidung durch die colorimetrische Bestimmung des ausgeschiedenen Valins nach FISCHER und DÖRFEL (1953) gemessen. In zwei Parallelansätzen wurde der Einfluß durch die Begasung auf den Fermentationsverlauf geprüft. Ein Ansatz wurde mit Luft begast, der andere mit einem Gasgemisch aus 70 % Wasserstoff, 20 % Sauerstoff und 10 % Kohlendioxyd.

Wenn der Mutante Fructose als C-Quelle gereicht wurde (Abb. 7), betrug die maximale Valinausscheidung 75 µg/ml. In dem mit Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlendioxyd begasten Ansatz wurde eine Ausscheidung von 80 µg/ml gefunden. Die Zunahme der Ausscheidung

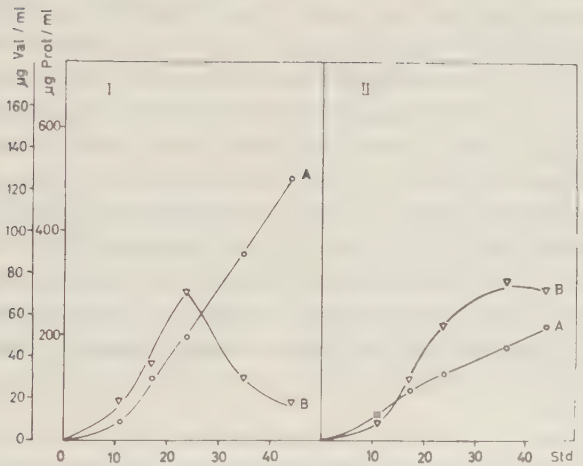


Abb. 7: Die Ausscheidung von Valin durch die Mutante TFL^r S 14 während des Wachstums auf Fructose.

1,5 l Fructose-Mineral-Nährlösung wurden mit 50 ml einer Vorkultur der Mutante TFL^r S 14, die auf FM-Nährlösung angezogen worden war, beimpft.
Der Ansatz I) wurde mit Luft begast;
II) wurde mit einem Gemisch aus 70 % Wasserstoff, 20 % Sauerstoff und 10 % Kohlendioxyd begast.
Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und
A) der Proteingehalt nach der Biuret-Methode (s. Methoden) und
B) die Menge des ausgeschiedenen Valins colorimetrisch nach FISCHER und DÖRFEL (1953) bestimmt.

war in beiden Ansätzen optimal zu Beginn des Wachstums der Bakterien; sie entsprach dem Fermentationsverlauf, der direkt an den primären Stoffwechsel gebunden ist. Die Produktbildung war eng mit dem Wachstum verknüpft. Die Proteinbildung verlief in

dem mit Wasserstoff begasten Ansatz mit geringerer Rate. Das war leicht erklärlich, da die Verwertung der Fructose durch Wasserstoff gehemmt wird (BLACKKOLB 1968) und die Wachstumsgeschwindigkeit bei der Verwertung des molekularen Wasserstoffs als Energiequelle erheblich geringer ist als bei der Verwertung von Fructose (WILDE 1961). Deutlich ließ sich ein konservierender Effekt des Wasserstoffs auf das ausgeschiedene Valin feststellen. Zu einem Zeitpunkt, an dem C- und N-Quelle noch vorhanden waren, wurde die Aminosäure in dem mit Luft begasten Ansatz von den Zellen aufgenommen und verwertet. Innerhalb von 20 Std. waren 80 % des anfänglich ausgeschiedenen Valins wieder verschwunden. Im Ansatz, der mit Wasserstoff begast worden war, war zum selben Zeitpunkt noch 90 % des ausgeschiedenen Valins vorhanden.

Durch Na-Pyruvat als C-Quelle konnte die Valinausscheidung auf 200 µg/ml gesteigert werden (Abb. 8). Gegen Ende des Wachstums wurde das ausgeschiedene Valin vollständig von den Zellen ver-

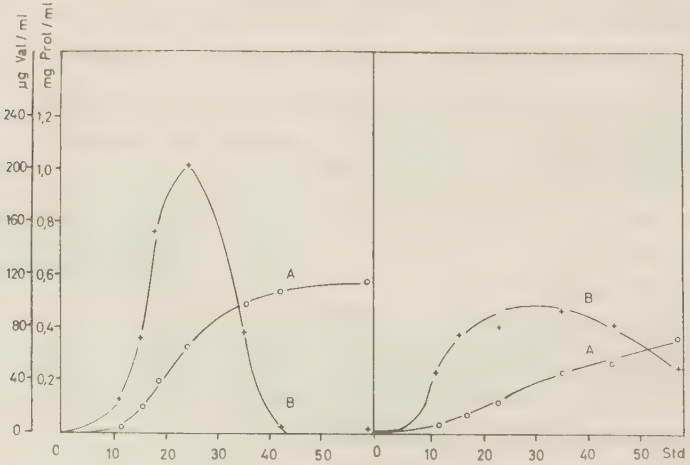


Abb. 8: Die Ausscheidung von Valin durch die Mutante TFL^r S 14 während des Wachstums auf Na-Pyruvat.

Ansätze und Bezeichnungen wie in Abb. 6. Als C-Quelle wurde 0,5 % Na-Pyruvat eingesetzt.

wertet. Im Ansatz, der mit Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlendioxyd begast worden war, wurde neben einer geringeren Proteinbildung eine verminderte Valinausscheidung gemessen. Es wurde aber ebenfalls ein deutlicher konservierender Einfluß des Wasserstoffs auf das ausgeschiedene Valin gefunden. Gekoppelt mit der Ausscheidung von Valin war die Akkumulation von Leucin in der Nährlösung. Bei der Fermentation auf Fructose betrug die maximale Leucinausscheidung weniger als 20 µg/ml. Bei der Fermentation auf Pyruvat wurden ungefähr 30 µg/ml Leucin ausgeschieden. Die Ausscheidung von Leucin war optimal nach Wachstum der Mutante auf Ammonium-Laktat (Abb. 9). Neben 270 µg Valin/ml wurden 65 µg Leucin/ml akkumuliert. Da der Ansatz mit Luft begast wur-

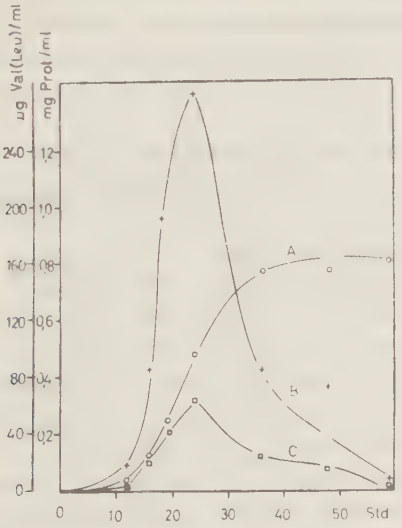


Abb. 9: Die Ausscheidung von Valin und Leucin durch die Mutante TFL^r S 14 während des Wachstums auf NH_4-Laktat.

Ansatz und Bezeichnungen wie Abb. 6. Als C-Quelle wurde 0,5 % NH_4-Laktat verwendet. Der Ansatz wurde mit Luft begast.
A) Proteinbildung
B) Valinausscheidung

de, wurden die ausgeschiedenen Aminosäuren wieder vollständig verwertet. In dem Ansatz war ein beträchtlicher Teil des Laktats in die Aminosäuren umgewandelt worden. Zur Bildung von 2,3 µmol Valin/ml und 0,5 µmol Leucin/ml sind 21,5 % des eingesetzten Laktats nötig.

Die Abhängigkeit der Produktbildung von der C-Quelle und der Begasung wurde in Tabelle 3 zusammengefaßt. Es konnten zwei verschiedene Gruppen von Substraten der Valinbildung erkannt werden. Durch die C_3-Substrate wurde die Valinbildung (µg ausgeschiedenes Valin je µg gebildetes Protein) um das 2,5fache gegenüber den C_6-Substraten erhöht. Der Wasserstoff hatte keinen Einfluß auf die Höhe der Ausscheidung.

Tab. 3: Die Valinausscheidung der Mutante während des Wachstums auf verschiedenen Substraten und mit verschiedener Begasung.

Substrat	Begasung	Protein nach 20 Std.	Valin nach 20 Std.	µg Val/ µg Prot
Fructose	Luft	205 µg/ml	55 µg/ml	0,27
Fructose	$H_2+O_2+CO_2$ *	120 µg/ml	45 µg/ml	0,38
Gluconat	Luft	210 µg/ml	60 µg/ml	0,29
Gluconat	$H_2+O_2+CO_2$ *	60 µg/ml	20 µg/ml	0,32
Pyruvat	Luft	210 µg/ml	170 µg/ml	0,81
Pyruvat	$H_2+O_2+CO_2$ *	120 µg/ml	80 µg/ml	0,67
Laktat	Luft	260 µg/ml	210 µg/ml	0,82

* Die Zusammensetzung des Gasgemisches war:
70 T. H_2 + 20 T. O_2 + 10 T. CO_2

2.4. Der Temperatureinfluß auf die Produktbildung.

Aus dem Verlauf der Produktbildung der Mutante während des Wachstums ging hervor, daß die Ausscheidung von Aminosäuren eng an das Wachstum geknüpft war. Es wurde geprüft, ob auch gewaschene Zellen, die aus der log-Phase einer wachsenden Kultur entnommen wurden, in der Lage waren, Aminosäuren auszuscheiden. Dabei wurde der Einfluß der Temperatur auf die Ausscheidung untersucht. Von Interesse war dabei das Verhalten gegen Temperaturen oberhalb des Wachstumsoptimums. Der Wildstamm H 16, ein mesophiler Organismus,ist gegen höhere Temperaturen sehr empfindlich. Ein fünf Minuten langes Erwärmen einer Zellsuspension auf 42°C setzt das Koloniebildungsvermögen um 90 % herab (KÖNIG 1967).

Aus logarithmisch wachsenden Kulturen wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und nach einmaligem Waschen in drei Ansätze aufgeteilt, die bei 28°, 36° und 42°C inkubiert wurden. Als Substrat wurde in einer Versuchsreihe Fructose, in einer anderen Ammonium-Laktat verwendet. Der Proteingehalt und die Ausscheidungsprodukte wurden zu Beginn der Inkubation und nach 6 Std. bestimmt.

In den Ansätzen, in denen Fructose als C-Quelle angeboten worden war (Tab. 4, A), erfolgte nur eine geringe Ausscheidung an Valin, die bei 36°C um die Hälfte geringer war als bei 28°C und bei 42°C nicht mehr nachweisbar war. Wurde dagegen Ammonium-Laktat als C-Quelle angeboten, erfolgte in allen Ansätzen eine Ausscheidung von Acetoin, Acetomilchsäure, Leucin und Valin. Durch höhere Temperaturen ließ sich die Produktbildung kräftig steigern. Bei 42°C wurden 46,5 % der eigesetzten Milchsäure in Fermentationsprodukte umgesetzt. Dabei wurde berücksichtigt, daß die Bildung von 1 umol Acetoin, Acetolaktat und Valin jeweils 2 umol Milchsäure erforderte, während zur Bildung von 1 umol Leucin, 3 umol Milchsäure notwendig waren.

Die Steigerung der Ausscheidung durch erhöhte Temperatur im Ansatz mit Ammoniumlaktat als C-Quelle war Ausdruck der erhöhten

Enzymaktivität der Biosynthesekette. Laktat wird über Pyruvat direkt in den Biosyntheseweg eingeschleust. Die Fructose muß in einer Reihe von Reaktionen zunächst in Pyruvat übergeführt werden. Diese Reaktionskette wurde anscheinend durch Temperaturen oberhalb des Wachstumsoptimums gestört. Die Ausscheidung im Ansatz mit Fructose als C-Quelle verringerte sich trotz erhöhter Aktivität der Valin-Biosynthesekette bei höheren Temperaturen.

Tab. 4: Die Fermentation durch gewaschene Zellen der Mutante TFL^r S 14 bei verschiedenen Temperaturen.

Ansatz	Temperatur	µg Val./ml	µg Leu./ml	µg Acetolaktat/ml	µg Acetoin je ml
A	28°	130	-	-	-
	36°	75	-	-	-
	42°	-	-	-	-
B	28°	390	178	231	10,7
	36°	550	203	353	27,3
	42°	600	335	1170	128,0

Die Zellen der Mutante TFL^r S 14 wurden A) in 0,5 l Fructose-Mineral-Nährlösung, B) in NH_4-Laktat angezogen. Nach Erreichen der Extinktion 1,0 wurde durch Zentrifugation geerntet. Es wurde einmal mit 150 ml Nährlösung gewaschen und dann in demselben Volumen einer 1 %igen Fructose-Nährlösung (Ansatz A) bzw. in 1 % NH_4-Laktat-Nährlösung (Ansatz B) suspendiert. Der Zellproteingehalt betrug im Ansatz A) 1,61 mg Protein/ml, im Ansatz B) 1,72 mg Protein/ml. Die Suspensionen wurden in jeweils 3 Kolben mit 50 ml aufgeteilt und in wasserbädern unter magnetischem Rühren bei 28°C, 36°C und 42°C inkubiert.

2.5. Die Leucin- und Trifluorleucinoxydation durch den Wildtyp H 16 und die Mutante TFL^r S 16

Die verhältnismäßig geringe Ausscheidung und die rasche Abnahme der akkumulierten Aminosäuren in den Fermentationsversuchen legten die Vermutung nahe, daß gleichzeitig mit der Ausscheidung eine Oxydation der betreffenden Aminosäuren stattfand. Ein konstitutiver Abbau von Aminosäuren, der strukturanaloge Verbindungen in physiologisch unwirksame Formen überführen würde, könnte darüber hinaus die Resistenz von antimetabolit-unempfindlichen Mutanten bedingen.(MOYED 1964). Durch die Untersuchung der Oxydationsfähigkeit und der Induktionsverhältnisse bei dem Wildtyp und bei einer trifluorleucin-resistenten Mutante wurde geprüft, ob eine Verwertung von Leucin und Trifluorleucin möglich war.

Der Wildtyp und die Mutante wurden in Mineral-Nährmedium angezogen und die Aktivität des Abbaues bestimmt. Um das Grundniveau der Oxydationsfähigkeit zu bestimmen, wurde als C-Quelle Fructose verwendet, zur Induktion der abbauenden Enzyme wurde zusätzlich L-Leucin zugefügt. Die Aktivität des Abbaues wurde durch die Messung des Sauerstoffverbrauches gewaschener Zellen nach Substratzusatz gemessen.

Der Wildtyp zeigte die Fähigkeit zur Leucinoxydation nur im induzierten Zustand (Abb. 10a und 10b). DL-Trifluorleucin wurde nach der Induktion ebenfalls oxydiert, wenn auch mit wesentlich geringerer Rate. Die gleichzeitig im Kulturmedium vorhandene Fructose übte keine Repression auf die Induktion der abbauenden Enzyme aus. Die Mutante dagegen zeigte einen scheinbar konstitutiven Abbau von Leucin und Trifluorleucin (Abb. 10c und 10d). Nach der Induktion durch exogen verabreichtes Leucin konnte nur eine 30%ige Zunahme der Oxydationsfähigkeit gemessen werden. Diese Dauerinduktion der leucin-abbauenden Enzyme könnte zur Trifluorleucinresistenz der Mutante beitragen. Die Resistenzeigenschaft der Mutante wurde durch eine Veränderung in der Regulation der Valin-Biosynthese verursacht (4.4.) Damit war sekundär eine Überproduktion an Leucin verknüpft, die teriär die In-

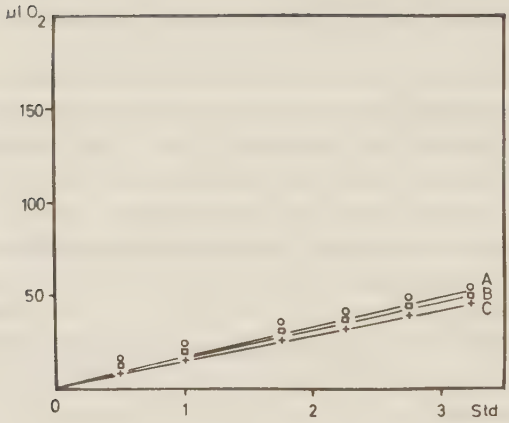


Abb. 10a: Die Leucin- und Trifluorleucinoxydation durch den nicht induzierten Wildtyp ^{H} 16.

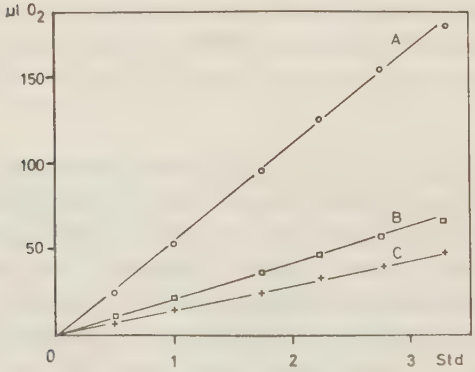


Abb. 10b: Die Leucin- und Trifluorleucinoxydation durch den induzierten Wildtyp H 16.

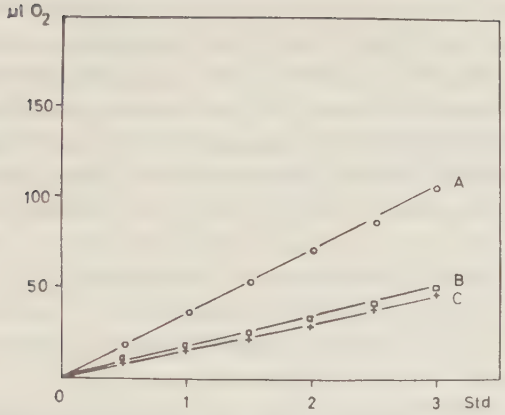


Abb. 10c: Die Leucin- und Trifluorleucinoxydation durch die nicht induzierte Mutante TFL^r S 16.

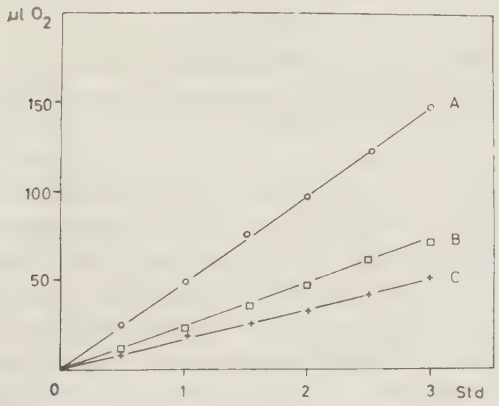


Abb. 10d: Die Leucin- und Trifluorleucinoxydation durch die induzierte Mutante TFL^r S 16.

Zu Abb. 10a - d: Die Zellen wurden zur Prüfung der Oxydationsfähigkeit im nicht induzierten Zustand auf Fructose-Mineral-Nährmedium angezogen. Zur Induktion der Abbauen-

zyme wurde dem Fructose-Mineral-Nährmedium 5 mM L-Leucin zugesetzt. Die Zellen wurden in der log-Phase geerntet, zweimal mit KPO_4-Puffer (0,067 m pH 7,0) gewaschen und in demselben Puffer auf eine Extinktion von 1,0 resuspendiert. In 13-15 ml Warburggefäße wurden nacheinander pipettiert: 2,0 ml Zellsuspension in den Hauptraum, 0,2 ml 20%ige KOH in den Zentralzylinder und 0,2 ml mit 10 µmol Substrat in den Seitenarm. Es wurde bei 30°C unter Luftatmosphäre inkubiert.

Der Ansatz A) enthielt L-Leucin als Substrat,
B) " DL-Trifluorleucin,
C) " kein Substrat (endogene Atmung).

duktion der leucin-abbauenden Enzyme verursachte. Wahrscheinlich wurden ebenfalls dieAbbauenzyme für die Valinverwertung induziert. Durch den dauerinduzierten Abbau wird die schnelle Abnahme der in der ersten Wachstumsphase akkumulierten Aminosäuren verständlich.

3. Die Leucinbiosynthese bei Hydrogenomonas H 16

3.1. Die Einordnung von auxotrophen Mutanten in das Biosyntheseschema

Mit Hilfe auxotropher Mutanten können Biosynthesewege aufgeklärt oder bestätigt werden, indem die Wuchsstoffansprüche der Mutanten bestimmt werden. Im einfachsten Fall werden die Wuchsstoffbedürfnisse durch die Akkumulationsprodukte anderer auxotropher Mutanten befriedigt. Durch die Klassifizierung einer Vielzahl von Mutanten in verschiedene Fütterungsgruppen kann die Zahl der an der Synthese beteiligten Enzyme bestimmt werden. Für die Biosynthese des Leucins sind drei Enzyme erforderlich (Abb. 11). Das erste Enzym ist die α-Isopropylmalat-Synthase (I) (JUNGWIRTH et al. 1961, 1963, BURNS et al. 1963 , STRASSMAN und CECI 1963, WEBSTER und GROSS 1965). Das Enzym katalysiert die irreversible Kondensation von Acetyl-Coenzym A mit α-Ketoisovaleriansäure zur α-Isopropyläpfelsäure. Im Folgenden wird es

als IPM-Synthase bezeichnet. Der nächste Schritt ist die Isomerisierung der Säure durch Wasserabspaltung und Wasseranlagerung (JUNGWIRTH et al. 1961, GROSS et al. 1963).Das zugehörige Enzym ist die Isopropylmalat-Isomerase (II). Bei Neurospora crassa wird es durch zwei Cistren codiert, durch eine 36fache Anreicherung konnte jedoch keine Trennung in verschiedene Enzymaktivitäten erreicht werden. In allen Anreicherungsstufen katalysiert das Enzym eine Gleichgewichtseinstellung zwischen drei Säuren. Im Gleichgewicht sind neben 8,7 Teilen α-Isopropyläpfelsäure, 3,4 Teile ß-Isopropyläpfelsäure und 1 Teil Isopropylmaleinsäure vorhanden (GROSS et al. 1963). Das letzte spezifische Enzym des Leucinweges katalysiert die Decarboxylierung der Isopropyläpfelsäure unter gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zur α-Keto-isocapronsäure. Die Kohlendioxydabspaltung bewirkt, daß dieser Schritt ebenfalls irreversibel ist (BURNS et al. 1963). Das Enzym wird als ß-Isopropylmalat-Dehydrogenase (III) bezeichnet. Die Transaminierung des α-Keto-isocaproats zum L-Leucin wird durch die Transaminase B (RUDMAN und MEISTER 1953) katalysiert. Das Enzym ist jedoch nicht spezifisch für Leucin und transaminiert ebenso Valin und Isoleucin mit α-Keto-glutarat. Mutanten mit blockierter Transaminase wurden von RAMAKRISHNAN und ADELBERG (1965) isoliert. Bei diesen Mutanten bestand ein gleichzeitiges Bedürfnis für Valin, Isoleucin und Leucin.

Nach der Methode von PEARCE und LOUTIT (1965) wurde der Wuchsstoffbedarf von 18 unabhängig voneinander isolierten leucinbedürftigen Mutanten geprüft, die stabil und nicht "leaky" waren. Die Mutanten wurden auf angereichertes Minimalmedium in der Weise aufgeimpft, daß die Impfstriche mit der Suspension aufgeschwemmter Zellen im rechten Winkel bis nahe an den Impfstrich einer anderen Mutante geführt wurde. Nach fünftägiger Inkubation bei 28°C wurde geprüft, ob eine Wachstumsstimulation von einer Mutante ausging.

Es konnten keine Fütterungsgruppen aufgestellt werden, die defekten Enzymen der Leucinsynthese entsprochen hätten. Außerdem war keine Mutante in der Lage, mit synthetischer DL-α-Isopro-

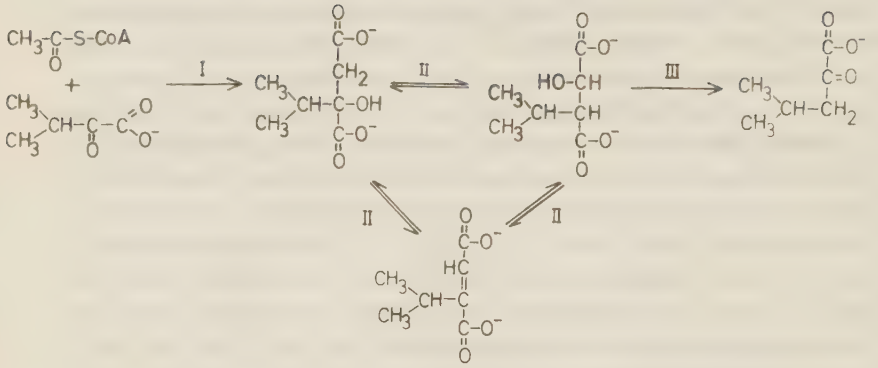


Abb. 11: Die Leucinbiosynthese nach BURNS et al. (1963).

pyläpfelsäure zu wachsen. Wahrscheinlich war bei allen Mutanten dasselbe Enzym defekt.

3.2 Nachweis der IPM-Synthase bei H 16

Es wurde geprüft, ob Hydrogenomonas über das charakteristische Enzym des Leucinbiosyntheseweges, die α-IPM-Synthase, verfügte. Aus einem Testansatz, der radioaktives Acetat, α-Keto-isovalerat, Coenzym A und ATP enthielt, wurde nach Inkubation mit einem Rohextrakt einer Mutante von H 16 radioaktive α-Isopropyläpfelsäure isoliert (Abb. 12). Die gereinigte α-IPM wurde von H 16 und Escherichia coli in unlösliche Zellbestandteile eingebaut. Das Experiment bewies, daß H 16 über den herkömmlichen Leucinbiosyntheseweg verfügte.

3.3. Der fluormetrische Nachweis der IPM-Synthase

Zum Nachweis und zum Aktivitätstest der IPM-Synthase werden verschiedene Verfahren angewendet. Am gebräuchlichsten sind Methoden, die die während der Reaktion aus dem Acetyl-Coenzym A freigesetzten SH-Gruppen bestimmen. Der Nachteil dieser Verfahren ist die Bestimmung einer Substratabnahme, die in Roh-

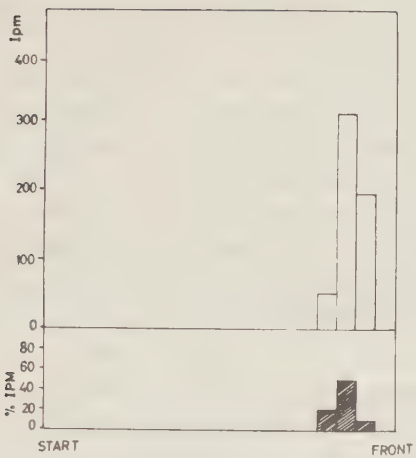


Abb. 12: Die Bildung ^{14}C-markierter α-Isopropyläpfelsäure durch einen zellfreien Extrakt aus H 16 vi$^-$ 43.

In ein Zentrifugenglas wurden nacheinander pipettiert: 7 ml KPO_4-Puffer (0,05 M, pH 7,4), 100 µmol Na-α-Keto-isovalerat, 3 mg CoASH, 45 mg ATP-Li_4 und 200 µmol K-^{14}C-1-acetat (12 880 IpM/µmol). Gestartet wurde durch die Zugabe von 0,7 ml (= 38 mg Prot.) Rohextrakt der H 16 vi$^-$ 43, die unter Valinbegrenzung auf Acetat gewachsen war. Nach 60 min. Inkubation bei 30°C wurde durch die Zugabe von 100 mg DL-α-Isopropyläpfelsäure und 0,5 ml 3 N H_2SO_4 abgestoppt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand 24 Std. kontinuierlich mit 50 ml Äther extrahiert. Nachdem der Äther abgedampft worden war, wurde der Rückstand in wenig heißem Äthylacetat aufgenommen, abgekühlt und die ausgefallenen Kristalle abfiltriert. Die Kristalle wurden in Wasser gelöst und papierchromatographisch gereinigt (MN Papier 214, Laufmittel: 13 T Äther-3 T Eisessig-1 T Wasser, aufsteigend). Die Zone, die die IPM enthielt, wurde ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und erneut papierchromatographiert.

Parallel zu einem Aliquot des Eluats wurde synthetische IPM cochromatographiert (MN Papier 2261, Äther-Eisessig-Wasser (s.o.), aufsteigend). Nach dem Trocknen des Chromatogramms wurde die synthetische IPM mit Bromthymolblau lokalisiert, die Laufstrecke des zu prüfenden Aliquots wurde in gleichgroße Segmente zerschnitten und die Radioaktivität in Bray-scher Lösung im Scintillationszähler bestimmt. In der Abb. 12 ist oben die Radioaktivitätsverteilung über die Laufstrecke des zu prüfenden Aliquots angegeben, darunter die Lokalisation der synthetischen IPM, wobei die Menge je Papiersegment aus der Indikatorfärbung abgeschätzt wurde.

extrakten durch andere Enzyme bewirkt werden kann. Bei Hydrogenomonas H 16 verhinderte die unspezifische Freisetzung von SH-Gruppen aus dem Acetyl-CoA einen Aktivitätstest im Rohextrakt auf dieser Grundlage. Es wurde eine quantitative Bestimmungsmethode der α-Alkyläpfelsäuren (STRASSMAN und CECI 1963, STRASSMAN et al. 1964) durch die Standardisierung von einzelnen Manipulationen zu einer serienmäßigen α-IPM-Bestimmung erweitert. Eine unter Testbedingungen aufgenommene Eichkurve zeigte eine lineare Beziehung zwischen eingewogener synthetischer α-IPM und gemessener Fluorescenz (s. Methoden). Rohextrakte aus Zellen von Hydrogenomonas H 16, die auf Fructose gewachsen waren, katalysierten die Bildung von α-IPM, das fluorometrisch nachgewiesen wurde. Dabei war die α-IPM-Bildung der Inkubationszeit bis zu 70 min proportional (Abb. 13) und der eingesetzten Proteinmenge des Rohextraktes bis zu 2 mg je Ansatz (Abb. 14). Höhere Proteinmenge bewirkten eine relativ geringere α-IPM-Bildung. Der vollständige Ansatz besaß die optimale Aktivität; durch Weglassen einzelner Komponenten wurde die Aktivität erheblich verringert (Tab. 5).

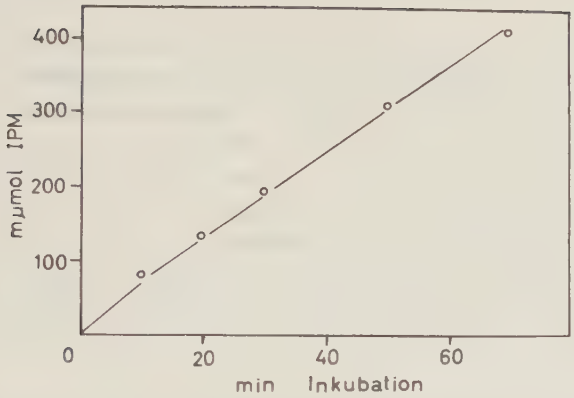


Abb. 13: Der zeitliche Verlauf der α-IPM-Bildung durch einen zellfreien Extrakt aus H 16.

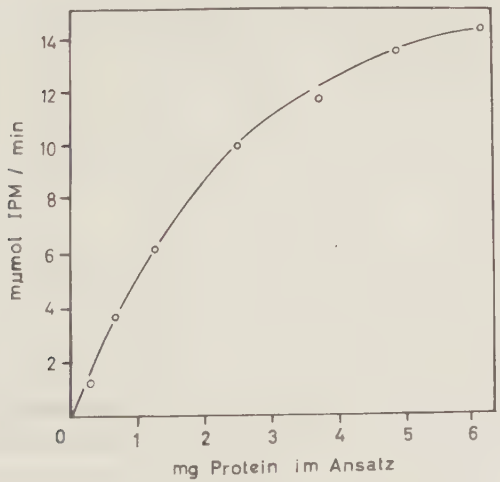


Abb. 14: Die Abhängigkeit der α-IPM-Bildung von der eingesetzten Rohextraktmenge.

Zu Abb. 13 und 14: Die Testansätze enthielten in einem Volumen von 2,0 ml : 200 µmol KPO_4 pH 7,4, 20 µmol K-α-Ketoisovalerat, 20 µmol Acetylphosphat-Li_2, 0,2 mg CoASH und 10 µg krist. Phosphotransacetylase. Durch Zugabe eines Rohextraktes aus Hydrogenomonas H 16 Zellen, die auf Fructose gewachsen waren, wurden die Ansätze gestartet. In Abb. 13 wurden 0,77 mg Protein eines Rohextraktes zugesetzt und verschieden lang bei 30°C inkubiert, in Abb. 14 wurden verschiedene Mengen Protein zugegeben und jeweils 30 min bei 30°C inkubiert. Die Ansätze wurden durch die Zugabe von 1 ml 3 N H_2SO_4 abgestoppt und wie in den Methoden angegeben aufgearbeitet.

Tab. 5: Die Verringerung der α-IPM-Bildung durch Weglassen einzelner Komponenten des Testansatzes.

Ansatz	Fluorescenz-einheiten	mµmole α-IPM gebildet	% des kompletten Tests
komplett	52	105,5	100
- Extrakt	6,5	0	0
- Coenzym A	9	5,7	5,5
- Acetylphosphat	8	3,5	3
- K-i-val	15	19,5	18,5
- Phosphotrans-acetylase	12	12,8	12
komplett, t = 0	6,5	0	0

Die Ansätze hatten die in Abb. 13 und 14 angegebene Zusammensetzung. Einzelne Komponenten wurden wie angegeben weggelassen. Gestartet wurde durch die Zugabe von 1,1 mg Prot. eines Rohextraktes aus H 16. Es wurde 30 min bei 30°C inkubiert.

3.4. Anreicherung der IPM-Synthase in Mutanten von Hydrogenomonas durch spezielle Anzuchtmethoden

Für eingehendere enzymatische Untersuchungen der IPM-Synthase mußte die spezifische Aktivität erhöht werden, da die Aktivität im Rohextrakt gering war (3,3 E/g Protein) und der hohe Anteil von begleitenden Enzymen die optimalen Reaktionsbedingungen stören konnte.

Eine Anreicherung von Enzymen war nach zwei verschiedenen Methoden möglich. Die Verfahren der klassischen Proteinfraktionierung führen durch Abtrennung von Fremdaktivitäten zu höheren spezifischen Aktivitäten. Durch die Schaffung von Derepressionsbedingungen kann eine "biologische Anreicherung" des Enzyms im Rohextrakt erreicht werden. Eine Derepression der Enzymsynthese ließ sich durch eine Begrenzung des Wachstums geeigneter auxotropher Mutanten in statischer Kultur erreichen.

Es wurde die für Valin und Isoleucin auxotrophe Mutante von Hydrogenomonas Vi$^-$ 43 eingesetzt, deren AHS-Synthase defekt war. Bei einer langsamen kontinuierlichen Zugabe von Valin und Isoleucin zu einer Kultur dieser Mutante konnte eine lineare Zunahme der Wachstumsgrößen gemessen werden (Abb. 15). Die Linearität spiegelte deutlich die Abhängigkeit von der zugesetzten Wuchsstoffmenge wieder. Nach den Angaben von ROBERTS et al. (1955) enthält das Protein von Escherichia coli 4,9 Molprozente Isoleucin, 7,9 % Leucin und 5,5 % Valin. Da die in dem Versuch eingesetzte Mutante kein Valin synthetisieren konnte, mußte das zugesetzte Valin sowohl als Proteinbaustein als auch zur Leucinsynthese verwendet werden. Da die Zusammensetzung der Bakterienproteine weitgehend gleich ist, konnte angenommen werden, daß auch in Hydrogenomonas H 16 wesentlich mehr Valin + Leucin als Isoleucin enthalten ist. Der das Wachstum begrenzende Faktor mußte das zugesetzte Valin sein.

Nach 32 Std. Wachstum waren aus 31 µg/ml zugesetztem Valin 225 µg/ml Protein gebildet worden. Das Trockengewicht war zum gleichen Zeitpunkt erheblich höher und lag bei 990 µg/ml. Diese

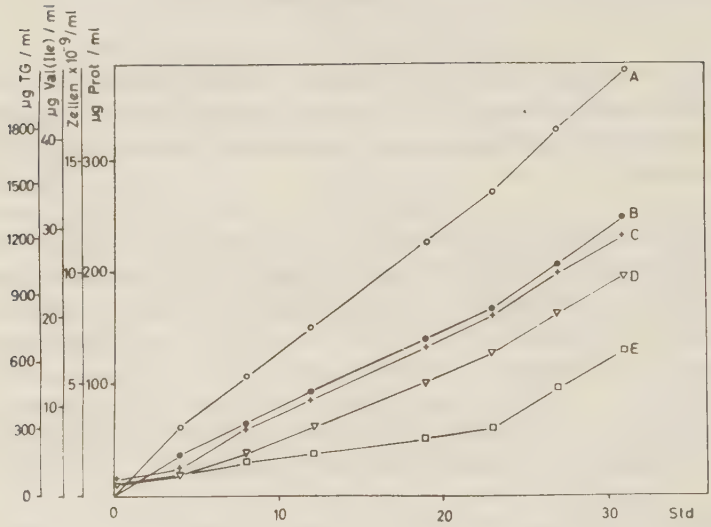


Abb. 15: Das Wachstum der Mutante H 16 vi$^-$ 43 in statischer Kultur unter Valinbegrenzung.

In Fructose-Mineral-Nährlösung mit je 10 mg L-Valin und L-Isoleucin pro 1 wurde die Mutante H 16 vi$^-$ 43 angezogen. Mit 250 ml der gut gewachsenen Vorkultur wurden 2,5 l Fructose-Mineral-Nährlösung angeimpft. Zu der Hauptkultur wurde mit gleichbleibender Geschwindigkeit eine Lösung von 3,3 mM L-Isoleucin und 2,66 mM L-Valin getropft. Nach verschiedenen Zeiten wurde bestimmt:

A) zugegebene Menge L-Isoleucin pro ml,
B) zugegebene Menge L-Valin pro ml,
C) gebildetes Protein pro ml,
D) gebildetes Trockengewicht (TG) pro ml und
E) Gesamtzellzahl pro ml.

Trockengewichtszunahme beruht offenbar auf der bevorzugten Anhäufung von Poly-ß-hydroxybuttersäure bei Hydrogenomonas H 16. Ein zellfreier Extrakt aus Bakterien, die unter den oben beschriebenen Bedingungen angezogen worden waren, hatte eine 14-26 fach erhöhte Aktivität der α-IPM-Synthase. Es wurden bis 83 E/g Protein gegenüber 3,4 E/g Protein beim Wildtyp gemessen. Der endogen das Wachstum begrenzende Faktor war offenbar Leucin, dessen Mangel in den Zellen zu einer Derepression der α-IPM-Synthasebildung führte.

3.5. Die Bestimmung des K_m-Wertes für α-Keto-isovaleriansäure

In dem verwendeten Test der IPM-Synthase konnte von den K_m-Werten für Acetyl-CoA und α-Keto-isovalerat nur derjenige für α-Keto-isovalerat bestimmt werden. Dazu wurde die Konzentration des Kalium-Salzes der Säure im Testansatz zwischen 0,25 mM und 20 mM variiert; durch die Lineweaver-Burk-Auftragung der Substrat-Geschwindigkeit-Beziehung wurde der K_m-Wert ermittelt. Der mit dem Rohextrakt gemessene K_m-Wert für α-Keto-isovalerat betrug $7,7 \times 10^{-4}$M. Für das gereinigte Enzym aus Neurospora crassa wurde ein Wert von 10^{-5}M mitgeteilt (WEBSTER und GROSS 1965), bei Saccharomyces cerevisiae wurde der K_m-Wert im Rohextrakt mit 10^{-3}M bestimmt (STRASSMAN und CECI 1963). Die IPM-Synthase von Hydrogenomonas H 16 wurde deutlich durch höhere Substratkonzentrationen von α-Keto-isovaleriansäure gehemmt (Abb. 16, A). Eine Substratkonzentration von 20 mM hemmte die Enzymaktivität um 25 % gegenüber der optimalen Konzentration des Substrates, die bei 3 mM lag. In Gegenwart von 0,15 mM L-Leucin war keine Substrathemmung zu beobachten (Abb. 16, B). L-Leucin hemmte die α-IPM-Synthase von Hydrogenomonas H 16 nicht-kompetetiv.

3.6. Die Hemmbarkeit der α-IPM-Synthase durch verschiedene Aminosäuren

Bei allen bisher untersuchten Organismen war die α-IPM-Synthase durch L-Leucin hemmbar. In einzelnen Fällen wurde berichtet, daß strukturanaloge Verbindungen ebenfalls die Aktivität des Enzyms

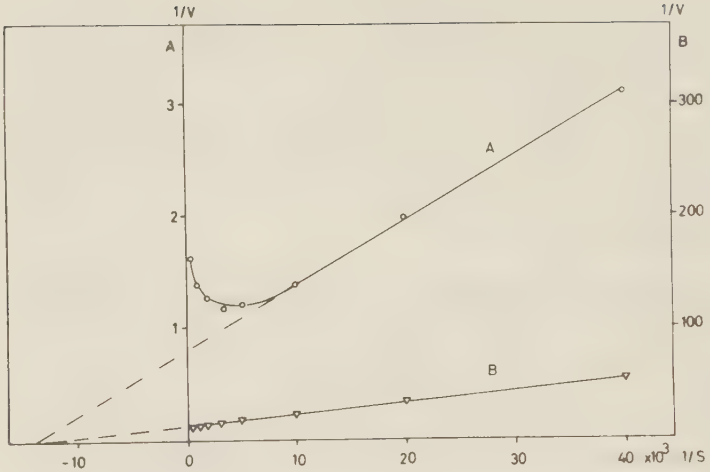


Abb. 16: Lineweaver-Burk-Auftragung der Substrat-Geschwindigkeit-Beziehung der α-IPM-Synthase für α-Keto-isovalerat.

Die Ansätze hatten die in Abb. 14 und 15 angegebene Zusammensetzung. Die Konzentrationen von K-α-Keto-isovalerat wurden zwischen 0,25 mM und 20 mM variiert. Die Ansätze wurden durch die Zugabe von 0,91 mg Protein eines Rohextraktes aus Zellen der Mutante H 16 vi⁻ 43 gestartet. Es wurde jeweils 15 min bei 30°C inkubiert.
Die Ansätze A) enthielten keinen weiteren Zusatz.
Die Ansätze B) enthielten jeweils 0,15 mM L-Leucin. Der Ordinatenmaßstab für B) wurde gegenüber A) 100fach verkleinert.

herabsetzen konnten, so bei Salmonella typhimurium Cyclohexanalanin (CALVO und UMBARGER 1963) und Trifluorleucin (UMBARGER et al. 1965). Bei Neurospora crassa waren unter bestimmten Bedingungen außer Leucin und Trifluorleucin auch Valin, Isoleucin und Azaleucin in geringem Maße als Hemmstoffe der α-IPM-

Synthase wirksam (WEBSTER und GROSS 1965).

Es wurde geprüft, ob auch bei Hydrogenomonas die IPM-Synthase, das erste für die Leucinbiosynthese spezifische Enzym, einer Endprodukthemmung durch L-Leucin unterliegt. Darüber hinaus wurde die Wirkung einiger stukturanaloger Verbindungen des L-Leucins auf die Aktivität der IPM-Synthase im Rohextrakt der Mutante vi$^-$ 43 untersucht. Es zeigte sich, daß nur L-Leucin und DL-Trifluorleucin Hemmstoffe der α-IPM-Synthase bei Hydrogenomonas waren. In 0,5 mM Konzentration, bezogen auf die L-Form, setzten diese Aminosäuren die Aktivität des Enzyms um 93 % bzw. 83 % gegenüber einem Ansatz ohne Hemmstoff herab (Tab. 6). Eine geringe Hemmwirkung übte auch D-Leucin aus; die Aktivität wurde dabei um 25 % vermindert. Die anderen geprüften Verbindungen DL-α-Aminobuttersäure, Cycloleucin, L-Isoleucin, DL-Norvalin, DL-Norleucin und L-Valin aktivierten in 0,5 mM Konzentration, jeweils bezogen auf den Gehalt an der L-Form, das Enzym um 8-21%.

Tab. 6: Die Hemmbarkeit der α-IPM-Synthase durch Leucin und strukturanaloge Verbindungen.

Zugesetzte Aminosäure	Konzentration (mM)	Aktivität (E/g Protein)	Prozent Aktivität *
-	-	81,6	100
DL-Aminobuttersäure	1,0	88,2	108
Cycloleucin	1,0	97,5	119,5
L-Isoleucin	0,5	89,8	111
L-Leucin	0,5	5,7	7
D-Leucin	0,5	61,2	75
DL-Norleucin	1,0	99,2	121,5
DL-Norvalin	1,0	91,0	111,5
DL-Trifluorleucin	1,0	13,9	17
L-Valin	0,5	95,2	116,5

*Aktivität der α-IPM-Synthase ohne Zusatz = 100 %.

3.7. Die Wirkung strukturanaloger Verbindungen auf die durch L-Leucin gehemmte α-IPM-Synthase

Da hemmende und aktivierende Aminosäuren strukturverwandt waren, lag ein kompetetiver Mechanismus der gegenseitigen Beeinflussung nahe. In einem weiteren Versuch wurde jedem Ansatz außer L-Leucin ein zehnfacher Überschuß einer strukturverwandten Aminosäure zugesetzt; damit wurde der Einfluß dieser Aminosäuren auf die Aktivität der durch L-Leucin gehemmten α-IPM-Synthase bestimmt. Durch einen zehnfachen Überschuß an Cycloleucin, Isoleucin, Norleucin, Norvalin und Valin ließ sich die Aktivität um das Vierzehnfache steigern (Tab.7).

Die Reaktivierung der durch L-Leucin gehemmten α-IPM-Synthase durch Valin und andere strukturverwandte Aminosäuren steht mit der Vorstellung in Einklang, daß es sich bei dem Enzym um ein allosterisches Enzym handelt. Das Produkt der Biosynthesekette Leucin fungiert als negativer allosterischer Effektor, die Reaktivierung durch L-Valin und andere Aminosäuren kann als positive allosterische Regulation angesehen werden.

Tab. 7 Die Wirkung von strukturanalogen Verbindungen des Leucins auf die durch 0,5 mM L-Leucin gehemmte α-IPM-Synthase

Zugesetzte Aminosäure	Konz. (mM)	Aktivität (E/g Prot.)	Steigerung * d.Aktivität	Prozent ** Aktivität
-	-	5,7	1	7
Cycloleucin	10	84,9	14,9	104
L-Glycylvalin	5	12,6	2,2	15
L-Isoleucin	5	79,2	13,9	97
D-Leucin	5	10,2	1,7	12
DL-Norleucin	5	80,0	14,0	98
DL-Norvalin	10	67,4	11,8	82
L-Valin	5	80,5	14,2	98

* Faktor der Aktivitätssteigerung gegenüber einem Ansatz mit 0,5mM L-Leucin.

** Aktivität des Ansatzes ohne Aminosäurezusätze =100%

Zur Tab. 7: Die Ansätze hatten die in Abb. 14 und 15 angegebene Zusammensetzung. Zusätzlich enthielt jeder Ansatz 0,5 mM L-Leucin und die weitere strukturanaloge Aminosäure in der angegebenen Konzentration.

Die Abhängigkeit der Aktivitätssteigerung der durch L-Leucin gehemmten α-IPM-Synthase von der zugesetzten Valinmenge wurde näher untersucht. Wie sich herausstellte (Abb. 17), wird die durch L-Leucin bewirkte Hemmung der α-IPM-Synthase durch steigende Mengen L-Valin aufgehoben. Liegt L-Valin in zehnfachem Überschuß vor (0,5 mM L-Leucin und 5 mM L-Valin), so erreicht die Enzymaktivität die der ungehemmten Kontrolle. Bei noch höheren Konzentrationen bewirkte L-Valin sogar eine Steigerung der Enzymaktivität auf 120 % des Ansatzes ohne Aminosäurezusätze.

3.8. Vergleichsuntersuchungen zur Reaktivierung der durch L-Leucin gehemmten α-IPM-Synthase durch L-Valin bei anderen Bakterien

Die Regulation der Leucinbiosynthese wurde bei anderen Mikroorganismen schon eingehend untersucht. Es wurde dabei kein Effekt beschrieben, der der Aktivitätssteigerung der durch das Endprodukt gehemmten α-IPM-Synthase durch strukturverwandte Aminosäuren vergleichbar wäre. Zur Entscheidung, ob eine ähnliche Reaktivierung auch in anderen Bakterien vorkommt, wurde die α-IPM-Synthase aus Escherichia coli K 12, Pseudomonas aeruginosa und Micrococcus denitrificans untersucht.

Es wurden Rohextrakte aus eingefrorenen Zellen dieser Bakterien bereitet, die auf Fructose-Mineral-Nährlösung angezogen worden waren. Die Aktivität der α-IPM-Synthase wurde fluorometrisch im unbehandelten Rohextrakt bestimmt. In weiteren Ansätzen wurde die Hemmbarkeit durch L-Leucin, DL-Trifluorleucin und die Aktivitätssteigerung des gehemmten Enzyms durch L-Valin untersucht.

An Pseudomonas aeruginosa und Escherichia coli wurden nur die bekannten Eigenschaften der α-IPM-Synthase dieser Organismen

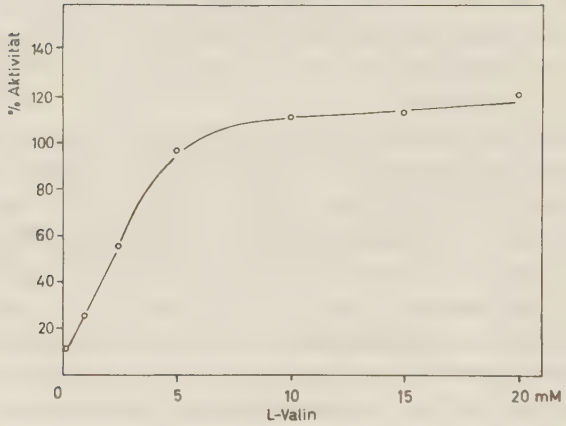


Abb. 17: Die Aktivitätssteigerung der durch L-Leucin gehemmten α-IPM-Synthase durch steigende Konzentrationen von L-Valin.

Die Ansätze hatten die in Abb. 13 und 14 angegebene Zusammensetzung. Zusätzlich wurde in jeden Ansatz 0,5 mM L-Leucin und verschiedene Mengen L-Valin gegeben. Es wurde durch die Zugabe von Protein eines Rohextraktes aus H 16 vi⁻ 43 Zellen, die unter Valinbegrenzung gewachsen waren, gestartet. In der Abb. ist die Reaktivierung der durch L-Leucin gehemmten α-IPM-Synthase durch steigende L-Valinkonzentrationen in Prozenten der Aktivität eines Testansatzes ohne Aminosäurezusätze wiedergegeben.

gefunden. Sie war durch L-Leucin (JUNGWIRTH et al. 1961, RABIN et al. 1968) und DL-Trifluorleucin hemmbar. Eine Erhöhung der durch L-Leucin herabgesetzten Aktivität der α-IPM-Synthase durch L-Valin konnte nicht nachgewiesen werden. Lediglich bei Micrococcus denitrificans trat ein ausgeprägter Effekt in Erscheinung. In vierfachem Überschuß gegenüber L-Leucin erhöhte L-Valin die Enzymaktivität auf 112 % der leucinfreien Kontrol-

le (Tab. 8). Die α-IPM-Synthase von M. denitrificans war darüber hinaus nicht gegen 2 mM DL-Trifluorleucin empfindlich. Auf Agarplatten mit 10^{-3}M DL-Trifluorleucin bildeten 10^{6} ausgespatelte Zellen nach einer Woche einen geschlossenen Rasen. Der Wildtyp von M.denitrificans ist natürlicherweise gegenüber Trifluorleucin resistent.

Tab. 8: Die Aktivität der α-IPM-Synthase bei verschiedenen Bakterienstämmen (E/g Protein).

Bakterienstamm	ohne Zusatz	+ 1mM Leu	+ 1mM Leu + 4mM Val	+ 2mM DL-TFL
E.coli K 12	12,8	0,12	0,14	0,59
P.aeruginosa	3,16	0,12	0,11	0,07
M.denitrificans	3,47	0,90	4,22	3,88
H. H 16	3,27	0,30	1,46	0,98

3.9. Die Abhängigkeit der Hemmung der α-IPM-Synthase von der Inhibitorkonzentration

Der Konzentrationsbereich, in dem L-Leucin und DL-Trifluorleucin die α-IPM-Synthase hemmten, wurde genauer untersucht. In jeweils zwei Testreihen wurde der Einfluß von L-Valin auf die durch verschiedene Inhibitorkonzentrationen erniedrigte Aktivität des Enzyms ermittelt.

Abb.18a zeigt, daß schon 0,1 mM L-Leucin zu einem 92%igen Aktivitätsverlust führten. Die Maximal erreichbare Hemmung durch L-Leucin lag bei 95 %. Gleichzeitig zugesetztes L-Valin verringerte die Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber dem Inhibitor. Bei 0,1 mM L-Leucin war in Gegenwart von 1 mM L-Valin noch 52 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Das Ausmaß der Hemmung durch L-Leucin entsprach der schon in Abschnitt 3.7. beschriebenen Abhängigkeit von dem jeweiligen Verhältnis Leucin : Valin.

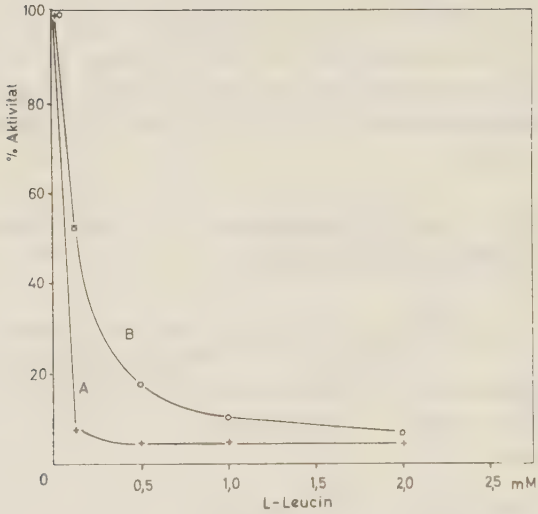


Abb. 18 a: Die Hemmung der α-IPM-Synthase in Abhängigkeit von der L-Leucinkonzentration.
A) ohne weiteren Zusatz
B) 1 mM L-Valin je Ansatz

Die Hemmung des Enzyms durch Trifluorleucin war nicht so ausgeprägt (Abb. 18b). Die maximale Hemmung betrug in Gegenwart von 2,5 mM DL-Trifluorleucin 85 % von der ursprünglichen Aktivität. Die Empfindlichkeit war bei kleinen Konzentrationen von Trifluorleucin geringer als bei vergleichbaren Leucinkonzentrationen. Zugesetztes Valin verschob den Empfindlichkeitsbereich des Enzyms zu höheren Trifluorleucinkonzentrationen.

3.10. Die Abhängigkeit der Hemmbarkeit der α-IPM-Synthase vom pH-Wert

Von allosterisch empfindlichen Enzymen ist bekannt, daß die Aktivität des katalytischen Zentrums und die Empfindlichkeit des allosterischen Zentrums in verschiedener Weise durch den pH-Wert

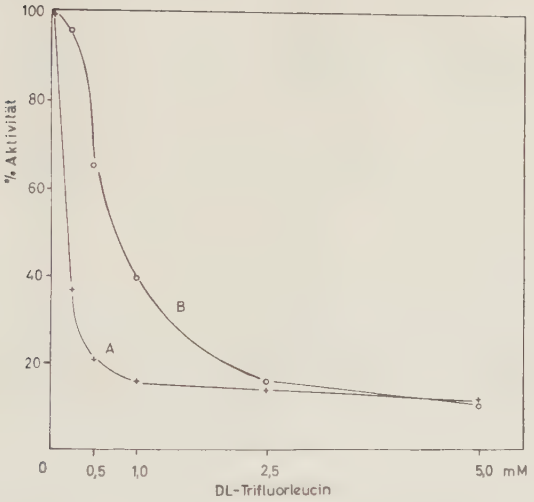


Abb. 18 b: Die Hemmung der α-IPM-Synthase in Abhängigkeit von der DL-Trifluorleucinkonzentration.
A) ohne weiteren Zusatz
B) 1 mM L-Valin je Ansatz

beeinflußt werden können. Die Abhängigkeit der Aktivität und der Hemmbarkeit der IPM-Synthase vom pH-Wert wurde mit einem Rohextrakt aus der Mutante H 16 vi⁻ 43 untersucht.

Wie sich herausstellte, war die katalytische Aktivität des Enzyms in hohem Maße vom pH-Wert abhängig. Zwischen pH 6,8 und 7,6 erfolgte eine über fünffache Steigerung der Aktivität (Abb. 19 I). Zwischen pH 7,6 und 8,4 blieb die Enzymaktivität konstant. Der Abfall der Aktivität im alkalischen Bereich konnte wegen der geringen Kapazität des Phosphatpuffers oberhalb pH 8 nicht verfolgt werden. Wenn die Aktivität des Ansatzes mit 0,5 mM L-Leucin als prozentualer Anteil des Ansatzes ohne Hemmstoff aufgetragen wurde, war ein deutliches Maximum der Hemmbarkeit

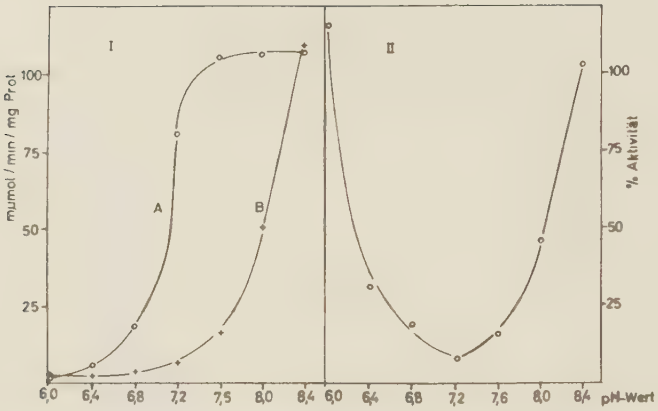


Abb. 19: Die Abhängigkeit der Aktivität und der Hemmbarkeit der α-IPM-Synthase durch L-Leucin vom pH-Wert.

Die Ansätze hatten die in Abb. 14 und 15 angegebene Zusammensetzung. Der KPO_4-Puffer wurde mit einer Glaselektrode auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Es wurde durch die Zugabe von 0,64 mg Protein eines Rohextraktes der Mutante H 16 vi^- 43, die unter Valinbegrenzung gewachsen war, gestartet.

I A) ohne weiteren Zusätze

I B) 0,5 mM L-Leucin je Ansatz

II) Aktivität der durch L-Leucin gehemmten Ansätze in Prozent des jeweiligen Ansatzes ohne Leucin ($\frac{I\ B}{I\ A}$ x 100).

des Enzyms durch L-Leucin zu erkennen, das bei pH 7,2 lag (Abb. 19 II). Es unterschied sich deutlich von dem pH-Optimum der katalytischen Aktivität, das bei pH 8,4 (bzw. darüber) lag. Bei den geprüften extremen pH-Werten (8,4 und 6,0) war die α-IPM-Synthase völlig unempfindlich gegenüber L-Leucin.

3.11. Die unspezifische Reaktion der α-IPM-Synthase mit α-Ketosäuren

Über die Unspezifität der α-IPM-Synthase für α-Ketosäuren ist mehrfach berichtet worden. Das Enzym aus verschiedenen Mikroorganismen katalysierte die Kondensation zwischen einer Reihe von α-Ketosäuren und Acetyl-CoA (CALVO et al. 1962, STRASSMAN et al. 1964, KOLHAW und UMBARGER 1965, WEBSTER und GROSS 1965, RABIN et al. 1968). Die entstandenen α-Alkyläpfelsäuren können zwar fluorometrisch bestimmt werden (STRASSMAN et al. 1964); da das Verfahren aber verhältnismäßig langwierig ist, wurde die unspezifische Kondensation anhand des Einbaues von radioaktiv markierter Essigsäure in die Alkyläpfelsäuren bestimmt. Als Maß desjenigen Anteils der Reaktion, der durch die IPM-Synthase katalysiert wurde, diente die Hemmbarkeit des Enzyms durch Leucin und die Reaktivierbarkeit durch Valin.

α-Ketobuttersäure wurde durch die IPM-Synthase aus Hydrogenomonas in höherer Rate als das eigentliche Substrat α-Ketoisovaleriansäure umgesetzt (Tab. 9). Diese bevorzugte Reaktion war von WEBSTER und GROSS (1965) schon bei Neurospora crassa gefunden worden. Wegen der geringen Affinität des Enzyms für α-Ketobutyrat maßen die Autoren der Reaktion aber keine physiologische Bedeutung zu. Auch die IPM-Synthase aus Pseudomonas aeruginosa reagierte mit α-Ketobutyrat in höherer Rate als mit α-Ketoisovalerat (RABIN et al. 1968). Bei Hydrogenomonas H 16 war der Umsatz der langkettigen α-Ketosäuren (α-Keto-n-valeriansäure, α-Keto-isocapronsäure) wesentlich geringer als der von α-Ketoisovaleriansäure. Alle Reaktionen wurden durch 0,5 mM L-Leucin zu 85-95 % gehemmt, mit Ausnahme der Malatbildung aus Glyoxylsäure und Acetyl-CoA, die nur schwach gehemmt wurde (17 %).

Im Zellstoffwechsel wird die Äpfelsäure normalerweise durch die Malat-Synthase aus Glyoxylsäure und Acetyl-CoA gebildet. Die schwache Hemmbarkeit der Reaktion durch L-Leucin deutete auf eine geringe Beteiligung der α-IPM-Synthase an der Kondensationsreaktion hin. Für die anderen unspezifischen Kondensationen zwischen α-Ketosäure und Acetyl-CoA lieferte die Aufhebung

Tab. 9: Die unspezifische Kondensation von α-Ketosäuren mit Acetyl-Coenzym A durch die α-IPM-Synthase.

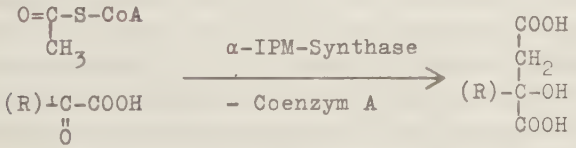
α-Ketosäure	I p m komplett	% Aktivität des Ansatzes mit K-i-val	I p m + 0,5 mM L-Leu	% Aktivität des Ansatzes ohne Leu	I p m + 0,5 mM L-Leu + 2,5 mM L-Val	% Aktivität des Ansatzes ohne Leu
α-Keto-iso-valeriansäure	2890	100	182	6,3	1470	51
Glyoxyl-säure	693	24	573	83	-	-
Brenztrauben-säure	2160	75	270	9,4	1280	59
α-Keto-n-buttersäure	4410	152	630	14,3	2540	57
α-Keto-n-valeriansäure	797	27,5	36	4,5	308	39
α-Keto-iso-capronsäure	299	10,3	14	5,3	-	-

Jeder Ansatz enthielt in 1,0 ml Volumen: 100 µmole KPO_4 pH 7,4, 10 µmole α-Ketosäure als Na^+-Salz, 10 µmole ^{14}C-1-Acetat-Na (spez. Aktivität 2,7 x 10^5 Ipm/µmol), 0,005 mg Protein krist. Phosphotransacetylase, 0,01 mg Protein krist. Acetokinase, 0,2 mg Coenzym A, 10 µmol $ATP\text{-}Na_4$ und Aminosäuren in den angegebenen Konzentrationen. Die Ansätze wurden durch die Zugabe von 0,65 mg Protein eines Rohextraktes der Mutante vi$^-$ 43, die unter Valinbegrenzung auf K-Acetat gewachsen war, gestartet. Nach 30 min. Inkubation bei 30°C wurde durch die Zugabe von 0,3 ml 3 N HCl abgestoppt. Weitere Aufarbeitung siehe nächste Seite.

Zur Tab. 9: Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert; 0,01 ml des klaren Überstandes wurden auf Chromatographiepapier aufgetragen (MN Typ 2216). Es wurde 14 Std. absteigend in einem Laufmittelgemisch aus 6 T Butanol-2 + 1 T Ameisensäure + 2 T Wasser chromatographiert. Die entwickelten Chromatogramme wurden luftgetrocknet und die Radioaktivität wurde mit dem Papierradiochromatographen lokalisiert. Die Zone mit den betreffenden Alkyläpfelsäuren wurde ausgeschnitten, mit 10 ml Bray'scher Lösung versetzt und im Scintillationszähler die Radioaktivität bestimmt.

der Leucinhemmung der Reaktion durch Valin einen weiteren Hinweis darauf, daß die Bildung der α-Alkyläpfelsäuren wirklich in erster Linie auf der Funktion der α-IPM-Synthase beruhte.

Die unspezifische Reaktion der α-IPM-Synthase kann in folgender Weise zusammengefaßt werden:



Der Rest R- der eingesetzten Ketosäuren, der nach der Kondensation den (Alkyl)-Substituenten der Äpfelsäure ergibt, kann nach den oben erwähnten Befunden sein:

eingesetzte α-Ketosäure	(Alkyl)-Substituent R-	gebildete (Alkyl)-Äpfelsäure
Glyoxylsäure	H-	Äpfelsäure
Brenztraubensäure	CH_3-	α-Methyläpfelsäure (= Citramalat)
α-Ketobuttersäure	CH_3-CH_2-	α-Äthyläpfelsäure
α-Keto-n-capronsäure	CH_3-CH_2-CH_2-	α-n-Propyläpfelsäure
α-Keto-isovaleriansäure	CH_3-$\underset{CH_3}{CH}$-	α-Isopropyläpfelsäure
α-Keto-isocapronsäure	CH_3-$\underset{CH_3}{CH}$-CH_2-	α-Isobutyläpfelsäure

3.12. Die Regulation der Bildung der α-IPM-Synthase

Bei Salmonella typhimurium ist die Information für die Bildung der Leucinbiosynthese-Enzyme auf dem Chromosom in einem typischen Operon vereinigt (MARGOLIN 1962). Nach einem Operatorgen liegen die Strukturgene unmittelbar nacheinander auf dem Bakterienchromosom. Das Operon wird durch das Endprodukt Leucin reguliert (BURNS et al. 1966). Bei Hydrogenomonas wurde der Einfluß von Leucin auf die Bildung der α-IPM-Synthase als repräsentativem Enzym der Leucinbiosynthese sowohl am Wildtyp als auch an auxotrophen Mutanten untersucht.

Zugesetztes L-Leucin reprimierte in den Wildtypzellen die Bildung der α-IPM-Synthase (Tab. 10). In einem Nährmedium, das zusätzlich 4 mM L-Leucin enthielt, war die Aktivität der α-IPM-Synthase auf ein Drittel gegenüber der Kontrolle erniedrigt, die ohne Leucinzusatz gewachsen war. Die reprimierende Wirkung des Leucins ließ sich auch bei den leucin- und valin-isoleucin-auxotrophen Mutanten, an der Derepression der α-IPM-Synthasebildung während des Wachstums erkennen. Durch einen endogenen Leucinmangel wurde in den Mutanten die Bildung des Enzyms dereprimiert, die Aktivität wurde dadurch um das 21-24fache gegenüber dem Wildtyp gesteigert.

Tab. 10: Die Regelung der Bildung der α-IPM-Synthase durch L-Leucin.

Stamm	Kultivierungsbedingungen	Aktivität der α-IPM-Synthase *)
H 16	Minimal-Fructose-Medium	3,4
H 16	" + 4 mM L-Leu	1,1
val⁻ 43	Valin-begrenztes Wachstum	81,6
leu⁻ 05	Leucin-begrenztes Wachstum	74,3

*) in E/g Protein.

3.13. Die Transaminierung von Leucin, Valin, Isoleucin und Trifluorleucin

Der letzte Schritt der Biosynthese des Isoleucins, Valins und Leucins besteht in der Transaminierung der jeweiligen α-Ketosäuren mit Glutaminsäure durch die Transaminase B (RUDMAN und MEISTER 1953). Es wurde geprüft, ob auch in Rohextrakten von Hydrogenomonas ein Enzym mit ähnlichen Eigenschaften vorhanden war. Da die Transaminierung der Aminosäuren mit α-Ketoglutarsäure der einleitende Schritt des Aminosäureabbaues ist, wurde gleichzeitig geprüft, ob eine Transaminierung von Trifluorleucin katalysiert wurde, dessen Abbau durch warburgversuche wahrscheinlich gemacht worden war (s. 2.5.). Nach der Methode von TAYLOR und JENKINS (1966) wurde die Aktivität der Transaminierung von Valin, Isoleucin, Leucin und Trifluorleucin mit α-Ketoglutarsäure als Acceptor bestimmt.

Für die Transaminierung des Leucins wurde eine Aktivität von 130 E/g Protein, für Valin 88 E/g Protein, für Isoleucin *) 90 E/g Protein und für Trifluorleucin *) von 58 E/g Protein im Rohextrakt von Hydrogenomonas H 16 gefunden.

Nach der Methode von TAYLOR und JENKINS (1966) war ein einfacher Nachweis der Substratspezifität der Transaminase B möglich. Das als Extraktionsmittel für die Dinitrophenylhydrazone benutzte Cyclohexan löste nur die Hydrazone des α-Ketoisocaproats und der Phenylbrenztraubensäure gut. Aminosäuren, die an Stelle des Leucins mit der Transaminase reagierten, hemmten scheinbar die Transaminierung des Leucins (Tab. 11). Eine scheinbare Hemmung

---

*) Die Extinktionskoeffizienten der Dinitrophenylhydrazone wurden nicht bestimmt. Den angegebenen Werten liegt die Annahme zugrunde, daß unter den Testbedingungen derselbe Extinktionskoeffizient vorlag, der für das Dinitrophenylhydrazon der α-Keto-isovaleriansäure bestimmt wurde (siehe Methoden).

Tab. 11: Die Beeinflussung der Leucin - α-Ketoglutarat Transaminierung durch verschiedene Aminosäuren.

Substrat	E_{440} x 100/min/mg Protein
L-Leucin	14,3
L-Leucin + DL-Trifluorleucin	7,0
L-Leucin + L-Valin	6,7
L-Leucin + L-Isoleucin	6,9
L-Leucin + L-Phenylalanin	28,6
L-Leucin + D-Leucin	14,8
L-Leucin + L-Isoleucin + L-Valin	5,0

Jeder Testansatz enthielt in 3 ml : 20 µmole der angegebenen Aminosäure (bzw. 40 µmole DL-Trifluorleucin), 20 µmole α-Ketoglutarsäure, 100 µmole Na-pyrophosphat und 1 µmol Pyridoxalphosphat. Es wurde durch die Zugabe von 0,6 mg Protein eines Rohextraktes aus Hydrogenomonas H 16 Zellen, die in Fructose-Mineral-Nährlösung gewachsen waren, gestartet. Nach dem Abstoppen wurde die wässrige Phase mit Cyclohexan extrahiert und wie üblich aufgearbeitet (s. Methoden).

verursachten Isoleucin, Valin und Trifluorleucin. Diese Aminosäuren wurden demnach auch durch die Leucintransaminase transaminiert. Das Substratspektrum der Leucintransaminase stimmte damit mit dem der Transaminase B (RUDMAN und MEISTER 1953) überein.

Trifluorleucin wurde durch die Transaminase B mit α-Ketoglutarat als Acceptor ebenfalls transaminiert. D-Leucin hatte keinen Einfluß auf den Aktivitätstest, während L-Phenylalanin eine

starke Aktivitätserhöhung bewirkte, was auf die Beteiligung einer weiteren Transaminase (Transaminase A) deutete.

4. Die Charakterisierung von trifluorleucin-resistenten Mutanten bei Hydrogenomonas H 16

4.1. Mutanten mit dereprimierter AHS-Synthase

Von den trifluorleucin-haltigen Anreicherungsplatten wurden bevorzugt diejenigen Mutanten isoliert, die einen Hof von Mikrokolonien um die Resistenzkolonie besaßen. Nach ADELBERG (1958) deutete die Satellitenbildung durch den Wildtyp auf eine Ausscheidung des Metaboliten hin. Bei der Identifizierung der Ausscheidungsprodukte stellte sich heraus, daß Valin die in größter Menge akkumulierte Aminosäure war (siehe Abschnitt 2.2.3. und 2.3.). Im Aktivitätstest der AHS-Synthase in toluolbehandelten ganzen Zellen der resistenten Mutanten zeigte sich, daß der größte Teil der satellitenbildenden Mutanten eine dereprimierte AHS-Synthase hatte (Tab. 12). Daß es dieser Defekt der Regulation der V_{a}lin-Isoleucinbiosynthese war, der den Mutanten die Resistenzeigenschaft verlieh, konnte durch eine von REH (1967) isolierte Mutante bestätigt werden. Diese Mutante, bei der die AHS-Synthase dereprimiert war, verhielt sich ebenfalls gegenüber Trifluorleucin resistent, obwohl sie während des Isolierungsganges niemals mit Trifluorleucin in Berührung gekommen war.

Im zellfreien Extrakt konnte ebenfalls die Erhöhung der AHS-Synthaseaktivität nachgewiesen werden. Die Mutante TFL^{r} S 14 hatte nach Anzucht auf Fructose-Mineral-Nährlösung eine 12fach erhöhte Aktivität gegenüber dem unter denselben Bedingungen geprüften Wildtyp H 16 (Abb. 20).

Es wurde geprüft, ob sich die Empfindlichkeit der AHS-Synthase gegenüber Valin durch die Mutation in der Mutante TFL^{r} S 14 verändert hatte. Dabei wurde gefunden, daß die AHS-Synthase der Mutante im selben Ausmaß wie bei dem Wildtyp durch L-Valin gehemmt wurde. Zwar verlor das Enzym bei Hydrogenomonas ebenso,

Tab. 12: Aktivität der AHS-Synthase in trifluorleucin-resistenten Mutanten.

Mutante	Aktivität der AHS-Synthase	Mutante	Aktivität der AHS-Synthase
(H 16 *)	1	S 14	15
S 1	18	S 16	1
S 2	17	S 17	3
S 3	1	S 18	23
S 4	22	S 19	1
S 5	6	S 20	1
S 6	14	R 1	1
S 7	4	R 2	1
S 8	1	R 3	1
S 9	6	R 4	1
S 11	1	R 5	1
S 12	4	R 6	1
S 13	20	R 7	1
		(R 3 **)	12

(*) Wildtyp

(**) von REH (1967) isolierte Mutante mit dereprimierter AHS-Synthase. Toluolbehandelte ganze Zellen, die in Fructose-Mineral-Nährmedium gewachsen waren, wurden auf eine Extinktion von 1,0 mit KPO_4-Puffer (0,1 M;pH 7,4) eingestellt. 0,5 ml der Bakteriensuspension wurde zu einem Ansatz, der in 0,5 ml 50 µmole Na-pyruvat, 1 µmol $MgCl_2$ und 0,1 mg Thiaminpyrophosphat enthielt, gegeben. Es wurde 30 min bei 30°C inkubiert und dann durch Zugabe von 0,3 ml 3 N H_2SO_4 abgestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, und im Überstand wurde nach Decarboxylierung des Acetolaktats das Acetoin quantitativ bestimmt. DieAcetoinbildung durch den Wildtyp unter diesen Bedingungen wurde gleich 1 gesetzt. Der Faktor der erhöhten Acetoinbildung bei den trifluorleucin-resistenten Mutanten wurde in der Tab. angegeben.

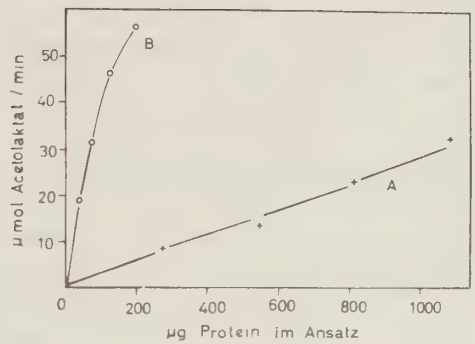


Abb. 20: Die Aktivität der AHS-Synthase im zellfreien Extrakt des Wildtyps H 16 und der Mutante TFL^r S 14.
A) Rohextrakt des Wildtyps
B) Rohextrakt der Mutante TFL^r S 14.

wie bei zahlreichen anderen Mikroorganismen durch den Aufschluß der Zellen teilweise die Empfindlichkeit gegen Valin, jedoch war bei dem Wildtyp und bei der Mutante eine ungefähr gleichgroße Hemmung durch 5 mM L-Valin von 76 % bzw. 62 % vorhanden (Abb. 21). Die Empfindlichkeit der AHS-Synthase der Mutante konnte durch das Weglassen von Mg^{++} aus dem Testansatz verstärkt werden, da Mg^{++} die Valinhemmung aufhob (REH 1968). Ohne Mg^{++} im Testansatz wurde die AHS-Synthase der Mutante durch 5 mM L-Valin zu 80 % gehemmt.

4.2. Die Stabilität von Mutanten mit dereprimierter AHS-Synthase

Nach den Untersuchungen von ZAMENHOF und EICHHORN (1967) werden regulationsdefekte Mutanten in Nährmedien ohne Selektionsvorteil bald von Revertanten überwachsen, die eine normale Regulation aufweisen. Unter den trifluorleucin-resistenten Mutanten von Hydrogenomonas H 16, deren AHS-Synthase dereprimiert war,

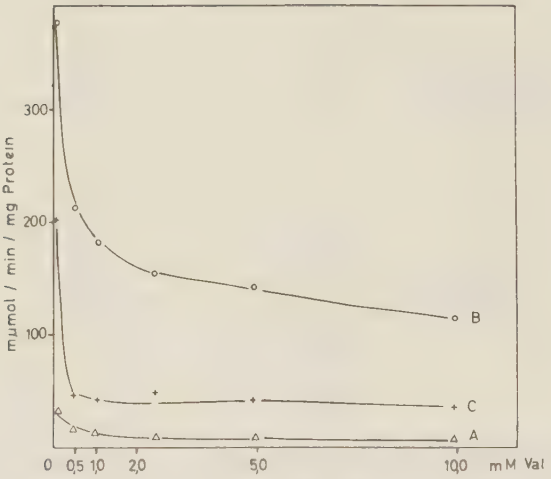


Abb. 21: Die Hemmbarkeit der AHS-Synthase der Mutante TFL^r S 14 und des Wildtyps durch L-Valin.

A) Wildtyp H 16
B) Mutante TFL^r S 14
C) Mutante TFL^r S 14 ohne Mg^{++} im Testansatz.

wurde nach mehrfacher Übertragung auf Fructose-Mineral-Nährlösung ebenfalls eine Abnahme der AHS-Synthaseaktivität gemessen. Nach mehrmaliger Übertragung waren die Stämme nicht mehr in der Lage, auf trifluorleucin-haltigen Medien zu wachsen.

Die "Deadaption" der Mutante wurde an Hand der Verringerung der α-Acetolaktatbildung durch toluolbehandelte Zellen gemessen. Nach viermaliger Übertragung in nicht-selektiven Medien (z.B. Fructose-Mineral-Nährlösung), war die stark erhöhte Acetolaktatbildung verloren gegangen (Abb. 22). Die höchste AHS-Synthaseaktivität wurde nach Wachstum der Mutante auf trifluorleucinhaltigem Nährmedium gemessen; durch die Mutante wurde 28mal mehr α-Acetolaktat gebildet als durch den Wildtyp. Durch die

Übertragung in nicht-selektive Nährmedien erfolgte eine kontinuierliche Abnahme der AHS-Synthaseaktivität. Es ist anzunehmen, daß die Abnahme der Enzymaktivität auf einer Anreicherung von Revertanten mit normal geregelter AHS-Synthasebildung beruht. Mangels ausreichender Mengen von Trifluorleucin wurde von einer experimentellen Prüfung dieser Interpretation abgesehen.

Die Stabilität der dereprimierten Mutanten war jedoch ausreichend für die in der Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Eine Population von Mutanten, die 14 Generationen auf nicht-selektiven Nährböden gewachsen waren, wuchs ohne Verzögerung in einer trifluorleucin-haltigen Nährlösung an (Abb. 23). Zur Anzucht größerer Zellmengen der Mutante wurden Einzelkolonien vom Schrägröhrchen abgeimpft, deren Agar 10^{-3}M Trifluorleucin enthielt.

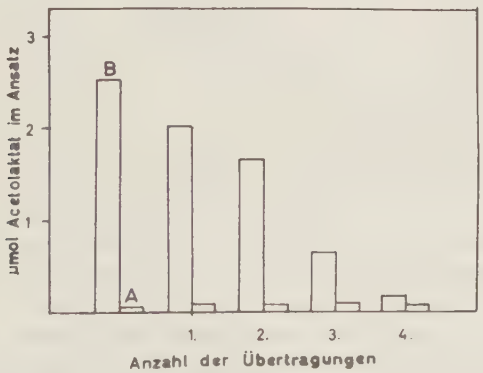


Abb. 22: Die Abnahme der AHS-Synthaseaktivität der Mutante TFL^r S 14 im Laufe mehrfacher Übertragungen in Fructose-Mineral-Nährlösung.

Die Mutante TFL^r S 14 wurde in Fructose-Mineral-Nährlösung $+10^{-3}$M DL-TFL angezogen. Mit 0,05 ml Zellsuspension wurde eine 10 ml Fructose-Mineral-Nährlösung angeimpft. Nach Wachstum wurde erneut 0,05 ml in 10 ml frische Mineral-Fructose-Nährlösung übertragen. Der Wildtyp H 16 wurde in entsprechen-

zu Abb. 22:
der Weise mehrmals überimpft. Die Acetolaktatbildung durch toluolbehandelte Zellen jeder gewachsenen Kultur wurde gemessen (s. Methoden). Die durch einen Ansatz nach 30 min Inkubation bei 30°C gebildete Acetolaktatmenge wurde in der Abb. durch eine Säule wiedergegeben.
A) Acetolaktatbildung durch den Wildtyp
B) Acetolaktatbildung durch die Mutante TFL^r S 14 nach Wachstum in Fructose-Mineral-Nährlösung +10^{-3}M DL-TFL.

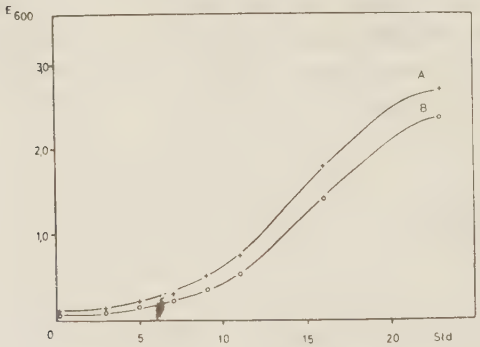


Abb. 23: Stabilität der Trifluorleucinresistenz bei der Mutante TFL^r S 14.

Zellen der Mutante TFL^r S 14, die in zwei Subkulturen (von je 10 ml) auf Fructose-Mineral-Nährlösung gewachsen waren, wurden auf die Fähigkeit zum Wachstum auf Trifluorleucinhaltigem Nährmedium geprüft. Es wurde (A) ein Fructose-Mineral-Nährmedium, das (B) zusätzlich 10^{-3}M DL-TFL enthielt, angeimpft und die Extinktionszunahme beider Ansätze im Photometer bei 600 nm verfolgt.

4.3. Trifluorleucin-resistente Mutanten mit veränderter Acetohydroxysäure-Synthase

Unter den trifluorleucin-resistenten, satellitenkolonienbildenden Mutanten waren auch Stämme ohne erhöhte AHS-Synthaseaktivität (siehe Tab. 12). Unter diesen resistenten Mutanten wurde eine mit einer veränderten AHS-Synthase gefunden. Diese Mutante, TFL^r S 16, hatte gegenüber dem Wildtyp nur ein Drittel der AHS-Synthaseaktivität (12,8 E/g Protein). Trotzdem schied die Mutante beim Wachstum auf Fructose-Mineral-Nährmedium 40 µg Valin/ml aus; auf Ammoniumlaktat betrug die Ausscheidung 120 µg Valin/ml. Die Überproduktion wurde durch die defekte Endproduktkontrolle des Enzyms verursacht (Abb. 24). Die Hemmbarkeit des Enzyms

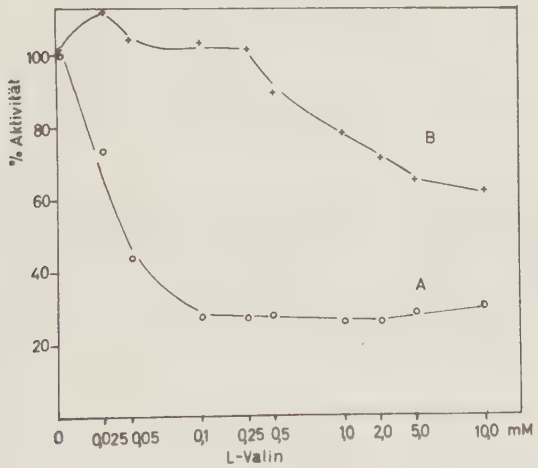


Abb. 24: Die Hemmbarkeit der AHS-Synthase durch L-Valin bei der Mutante TFL^r S 16 und dem Wildtyp H. H 16.

A) Hemmung durch Valin im Rohextrakt des Wildtyps Hydrogenomonas H 16.

B) Hemmung durch Valin im Rohextrakt der Mutante TFL^r S 16.

Es wird die Aktivitätsabnahme in Prozenten einer valinfreien Kontrolle angegeben.

durch zugesetztes Valin war erheblich vermindert. 0,25 mM Valin, die beim Wildtyp die Aktivität um 70 % verminderten, hatten keine Hemmwirkung auf das Enzym aus der Mutante. Auch bei hohen Valinkonzentrationen war die Hemmwirkung nur gering. 5 mM L-Valin verminderten die Aktivität des Enzyms um 35 %.

Die Trifluorleucinresistenz dieser Mutante wurde ebenfalls durch die erhöhte Valinbildung verursacht. Daß trotz der verminderten Enzymaktivität das Endprodukt im Überschuß gebildet wurde, unterstreicht die Bedeutung der Endproduktthemmung als Feinregulationsmechanismus in der Zelle.

4.4. Die Isolation von Revertanten mit veränderter AHS-Synthase

CHANGEUX (1963) beschrieb die Isolierung von Mutanten bei Escherichia coli, die eine veränderte Isoleucinempfindlichkeit der Threonin-Desaminase aufwiesen. Durch analoges Vorgehen ließen sich auch von Hydrogenomonas H 16 Mutanten isolieren, die eine gegen Valin unempfindliche AHS-Synthase besitzen.

Als Ausgangsstamm wurde die Mutante H 16 vi^{-} 34 benutzt, die eine defekte AHS-Synthase hatte. Auf einer Fructose-Mineral-Agarplatte wuchs der Stamm wegen seines Bedürfnisses für Valin und Isoleucin nicht. Nach dem Ausplattieren von 10^{7} Zellen entwickelten sich jedoch nach einer Woche bis zu 100 prototrophe Revertanten auf jeder Minimalplatte. Nach weiteren 7 Tagen gaben sich einige Revertantenkolonien als ausscheidende Mutanten zu erkennen: Um die Kolonie herum entwickelte sich ein Hof von Mikrokolonien des auxotrophen Elternstammes. Dieser Hof zeigte an, daß Valin und Isoleucin oder Vorläufer der beiden Aminosäuren ausgeschieden wurden. Die Revertanten wurden isoliert, durch Ausstrich auf Nutrient-broth-Agarplatten gereinigt und auf ihre Ausscheidung geprüft.

Die Aminosäureausscheidung durch die Mutante SR II a wurde auf Fructose und Milchräure als Kohlenstoff- und Energiequelle gemessen. Wurde Fructose eingesetzt, betrug die maximale Valinausscheidung 35 ug/ml (Abb. 25 I). Eine Isoleucinausscheidung war

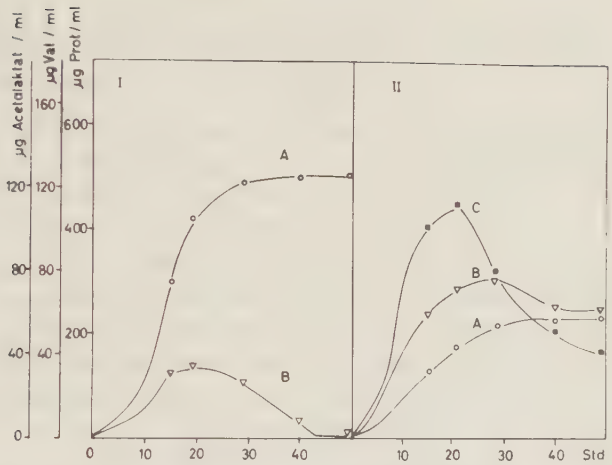


Abb. 25: Die Ausscheidung von Valin durch die Mutante SR II A während des Wachstums auf Fructose (I) und auf Ammoniumlaktat (II).

1,5 l Mineral-Nährlösung mit (I) 0,5% Fructose und (II) 0,5% NH_4-Laktat als C-Quelle wurden mit einer 50 ml Vorkultur der Mutante SR II A angeimpft. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und (A) der Proteingehalt, (B) die Valinausscheidung und (C) die Acetolaktatausscheidung bestimmt.

chromatographisch nicht nachweisbar. Durch Milchsäure wurde die Valinakkumulation auf 75 ug/ml gesteigert, zusätzlich wurde α-Acetolaktat (110 ug/ml) in die Nährlösung ausgeschieden. Darüber hinaus wurde eine geringe Menge Leucin akkumuliert, die in der Abb. 25 II nicht wiedergegeben wurde.

Die isolierten Revertanten waren gegen 10^{-3} M DL-Trifluorleucin im Nährmedium resistent. Die Resistenz dieser Mutanten bestätigte den Befund, daß bei Hydrogenomonas H 16 eine Überproduktion an Valin eine Resistenz gegen Trifluorleucin verursachte.

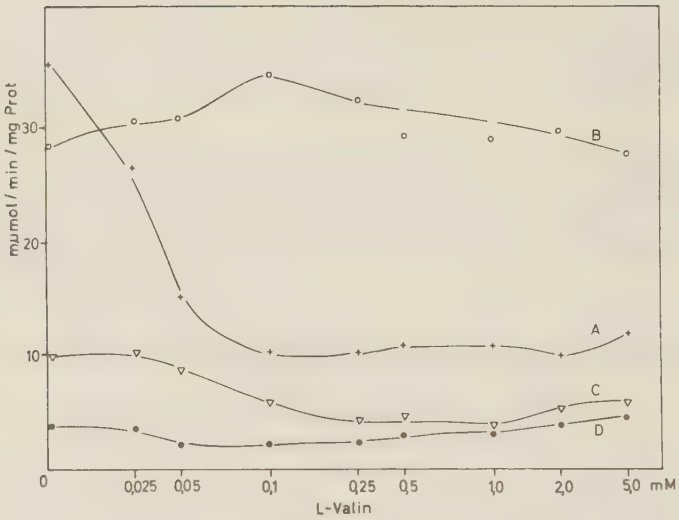


Abb. 26: Die Hemmbarkeit der AHS-Synthase im Rohextrakt von drei prototrophen Revertanten der auxotrophen Mutante vi⁻ 34.

Die Hemmbarkeit der AHS-Synthase durch L-Valin wurde im Rohextrakt (A) des Wildtyps H 16, (B) der Mutanten IA, (C) SR IC und (D) SR II A bestimmt.

Die AHS-Synthase dieser Revertanten war gegenüber Valin unempfindlich (Abb. 26). Bei zwei Mutanten war die katalytische Aktivität des Enzyms ebenfalls herabgesetzt. Die Mutante SR I C und die Mutante SR II A hatten nur 30 % bzw. 12 % der AHS-Synthaseaktivität des Wildtyps. Die Mutante SR I A besaß noch 85 % der katalytischen Aktivität des Wildtyps. Trotz der erniedrigten Enzymaktivität bewirkte die Valinunempfindlichkeit bei allen Revertanten eine Überproduktion an Valin. Die Fütterung des auxotrophen Elternstammes zeigte darüber hinaus an, daß Isoleucin oder ein Vorläufer (wahrscheinlich α-Acetohydroxybuttersäure) im

Überschuß gebildet und ausgeschieden wurde.

4.5. Trifluorleucin-resistente Mutanten mit veränderter Regulation der Leucinbiosynthese

Es ist bereits mehrfach über Mutanten berichtet worden, deren Resistenz gegenüber Trifluorleucin auf einem Defekt in der Biosynthese des Leucins beruht. Bei den bisher untersuchten Mikroorganismen, Salmonella typhimurium und Neurospora crassa (UMBARGER et al. 1965, WEBSTER und GROSS 1965) wurden unter den trifluorleucin-resistenten Mutanten sogar ausschließlich solche aufgefunden, bei denen die Regulation der Leucinbiosynthese defekt war. Bei Hydrogenomonas schieden diese Mutanten keine oder nur geringe Mengen Aminosäuren in das Kulturmedium aus. Da sich diese Arbeit in erster Linie auf ausscheidende Mutanten konzentrierte, die zur Satellitenbildung befähigt waren, wurden Mutanten mit defekter Regulation der Leucinsynthese nur selten isoliert.

Die trifluorleucin-resistente Mutante TFL^r R 2 hatte eine dereprimierte IPM-Synthase. Nach Anzucht auf Fructose-Mineral-Nährlösung wurde im Rohextrakt eine Aktivitätserhöhung des Enzyms auf 35,8 E/g Protein gemessen, was einer 11fachen Erhöhung gegenüber der Aktivität des Wildtyps entsprach. Die Mutante schied keine Aminosäuren aus und bildete auf trifluorleucinhaltigem Nährboden große Kolonien. Der Anteil dieser Mutanten überwog auf den Anreicherungsplatten, wurde jedoch zunächst wegen der fehlenden Aminosäureausscheidung nicht weiter untersucht.

Den Typ der Resistenzmutanten mit veränderter Leucinempfindlichkeit der α-IPM-Synthase repräsentiert die Mutante TFL^r S 8 (Abb. 27). Die Aktivität des Enzyms im zellfreien Extrakt betrug 3,2 E/g Protein und entsprach damit fast genau der Aktivität des Wildtyps. Die Empfindlichkeit des Enzyms gegen L-Leucin war stark herabgesetzt. Bei einer Konzentration von 2 mM L-Leucin wurde die Aktivität des Enzyms nur zu 32 % gehemmt, während das Enzym des Wildtyps unter diesen Bedingungen zu 95 % gehemmt wurde. Die Mu-

tante schied etwas Leucin aus, was durch eine schwache Satellitenbildung auf trifluorleucin-haltigem Agar angezeigt wurde. Auf Minimalmedium wurde die leucin-auxotrophe Mutante H 16 leu^- o5 in geringen Maße gefüttert.

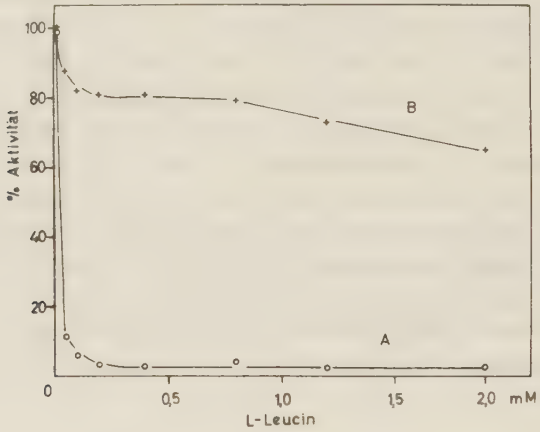


Abb. 27: Die Hemmbarkeit der α-IPM-Synthase durch steigende Konzentrationen von L-Leucin im Rohextrakt des Wildtyps H 16 und der trifluorleucin-resistenten Mutante TFL^r S 8.

A) Wildtypenzym
B) Enzym der Mutante TFL^r S 8.

Ordinate: α-IPM-Synthaseaktivität in Prozenten der im jeweiligen leucinfreien Ansatz gemessenen Aktivität.

5. Die Aminosäureausscheidung durch die Mutante vi⁻ 43

5.1. Die Leucinausscheidung durch die Mutante vi⁻ 43

Die Aufhebung eines einzelnen Regulationsmechanismus führte, wie die Versuche mit trifluorleucin-resistenten Mutanten zeigten, zu einer nur geringen Ausscheidung von Aminosäuren. Unter chemolithoautotrophen Wachstumsbedingungen wurde die Ausscheidung sogar völlig eingestellt. Von anderen Organismen war bekannt, daß die Kombination von Regulationsdefekten zu einer starken Erhöhung der Ausscheidungsprodukte führte. Ein Stamm von Salmonella typhimurium, in dem sowohl die Bildung als auch die Aktivität der α-IPM-Synthase keiner Kontrolle mehr unterlag, schied große Mengen Leucin aus (CALVO und CALVO 1967). Die Transduktion eines zweiten Regulationsdefektes in eine Zelle bewirkte, daß 51 % der angebotenen Glucose in Leucin umgewandelt und ausgeschieden wurde. Für Hydrogenomonas H 16 ist noch kein genetisches System bekannt, mit dem eine Merkmalskombination hätte vorgenommen werden können. Die Wirkung der Kombination einer dereprimierten und daueraktivierten α-IPM-Synthase ließ sich jedoch an einem Modellsystem untersuchen. Dazu wurde die auxotrophe Mutante H 16 vi⁻ 43, deren AHS-Synthase defekt ist, mit Isoleucin- und Valinzusatz herangezogen, wobei Valin das Wachstum begrenzte. Der Valinmangel führte zu einem endogenen Leucinmangel und dieser wiederum verursachte die Derepression der α-IPM-Synthase (siehe Abschnitt 3.4. und 3.12.). Durch den nachfolgenden Zusatz von leucinanalogen Verbindungen wie Valin, α-Aminobuttersäure, Norvalin und Norleucin ließ sich zusätzlich die Endproduktheмmung des L-Leucins auf die α-IPM-Synthase aufheben (siehe Abschnitt 3.7.).

Unter diesen Versuchsbedingungen entsprach die Mutante einem Modellsystem für die Kombination von defekter Repression und defekter allosterischer Hemmbarkeit, obwohl im genetischen Material der Zelle die Information für beide Regulationsmechanismen völlig intakt war.

Wurden die Zellen unter den oben genannten Bedingungen herange-

zogen und mit Valin und einer weiteren C-Quelle versetzt, so schied die Mutante beträchtliche Mengen Leucin aus (Tab. 13). Valin ist ein Vorläufer des Leucins und wurde zu Leucin umgesetzt. Die Leucinausscheidung wurde bei fortlaufendem Valinverbrauch schließlich eingestellt, da das angehäufte Leucin die α-IPM-Synthase allosterisch hemmte.

Tab. 13: Die Ausscheidung von Leucin durch die AHS-Synthase defekte Mutante H 16 vi⁻ 43 in Gegenwart von Valin.

Gewachsen auf	Zeit (Std.)	Valin ug/ml	Leucin ug/ml	Zellprotein mg/ml	Ausbeute an Leucin*)
Fructose	0	800	0	2,6	-
	10	50	340	2,7	43 %
Acetat	0	950	0	2,1	-
	22	510	580	2,6	55 %

*) Leucinausbeute in Prozenten der eingesetzten Valinmenge.

Die Mutante H 16 vi⁻ 43 wurde unter Valinbegrenzung in einer Valin und Isoleucin enthaltenden Fructose- (bzw. Acetat)-Mineral-Nährlösung angezogen, durch Zentrifugation geerntet und in einer Lösung aufgeschwemmt, die in 70 ml 0,1 M KPO_4-Puffer pH 7,2 folgende Substanzen enthielt: 10 mg/ml Fructose (bzw. K-Acetat), 2 mg/ml Ammoniumsulfat, 1 mg/ml L-Valin und 100 µg/ml Chloramphenicol. Es wurde in einem Wasserbad unter magnetischer Rührung bei 30°C inkubiert; zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen. Der Aminosäure- und Proteingehalt der Proben wurde bestimmt.

5.2. Die Ausscheidung von ^{14}C-markiertem Leucin

Der Verlauf der Aminosäureausscheidung durch die Mutante H 16 vi⁻ 43 wurde unter Einsatz von radioaktivmarkierter Essigsäure eingehender untersucht. Dazu wurde die Mutante wie in dem voran-

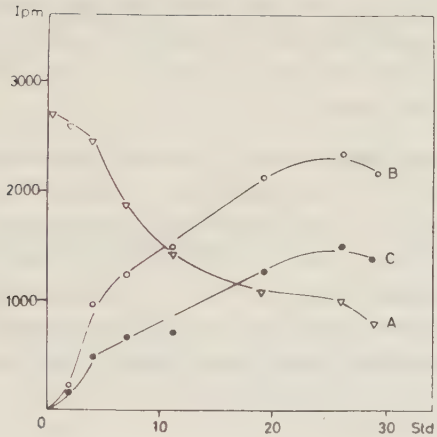


Abb. 28: Der Verlauf der Bildung von ^{14}C-1-Leucin aus Valin und ^{14}C-1-Acetat durch die Mutante H 16 vi$^-$ 43.

Die unter Valinbegrenzung auf Acetat gewachsenen Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in einer Lösung suspendiert, die folgende Zusammensetzung hatte: 70 ml 0,1 M KPO_4-Puffer pH 7,2, 10 mg/ml Ammonium-^{14}C-1-Acetat (spez. Aktivität 20 100 Ipm/ µmol), 0,2 mg/ml Chloramphenicol und 2 mg Valin/ml. Der Zellproteingehalt betrug 2,5 mg/ml. Es wurde schwach belüftet, magnetisch gerührt und bei 30°C inkubiert. In den zu verschiedenen Zeiten entnommenen Proben wurde (A) die Radioaktivität in 1 µl Suspension, (B) die Radioaktivität in 10 µl nach Sterilfiltration und Dowex-1/ Formiat-Behandlung und (C) die Radioaktivität von (B), die sich nach Papierchromatographie (MN Papier 2261, Butanol (80)-Eisessig (20)-Wasser (20), absteigend) in der Leucinposition des entwickelten Chromatogramms befand, bestimmt.

gehenden Versuch (siehe Tab. 13) unter Valinbegrenzung angezogen, durch Zentrifugation geerntet und in einer Nährlösung mit Valin und ^{14}C-1-Essigsäure aufgenommen. Der Verlauf der Fermentation wurde an der Zu- und Abnahme der Radioaktivität in den Produkten des Ansatzes verfolgt.

Im Laufe der Versuchszeit waren 70 % der eingesetzten Essigsäure veratmet worden. 10 % fanden sich in neutralen oder basischen Verbindungen, die von den Zellen ausgeschieden worden waren, wieder (Abb. 28). Nach der Papierchromatographie befanden sich 64 % dieser Radioaktivität in der Leucinposition auf dem entwickelten Chromatogramm. Unter der Annahme, daß das gebildete Leucin die gleiche spezifische Aktivität wie das eingesetzte Acetat aufwies, bedeutete das, daß 47 % des Valins zu Leucin umgesetzt worden war.

Zur Prüfung des Leucins auf die spezifische Radioaktivität und zur Bestimmung der Isotopenverteilung im gebildeten Leucin wurde die Aminosäure aus dem Fermentationsansatz nach folgendem Schema isoliert.

Der Ansatz wurde 20 min bei 30 000 g zentrifugiert

↓

Überstand durch Membranfilter MF 14 sterilfiltriert

↓

Auf eine Dow-1/Formiatsäule gegeben (2,5 x 15), und mit 150 ml Wasser nachgewaschen.

↓

Der Durchfluß mit HCl angesäuert und eingedampft

↓

Trockenen Rückstand 3 x mit Methanol extrahiert

↓

Methanolextrakt eingeengt und präparativ auf Papier chromatographiert

↓

Wiederholte Chromatographie des Leucins bis zur konstanten Aktivität.

Elution von Säuren mit 200 ml 1 N HCl

↓

Eluat unter vermindertem Druck (12 mm Hg) auf 20 ml eingeengt

↓

Papierchromatographischer Nachweis von ausgeschiedenen ^{14}C-markierten, nicht wasserdampfflüchtigen Säuren.

Die Isolierung des radioaktiven Leucins aus dem Überstehenden des sterilfiltrierten Fermentationsansatzes ist in Abb. 29 wiedergegeben. Der Radioaktivitätspeak des ausgeschiedenen Leucins ist schon im Papierchromatogramm des unbehandelten Überstehenden

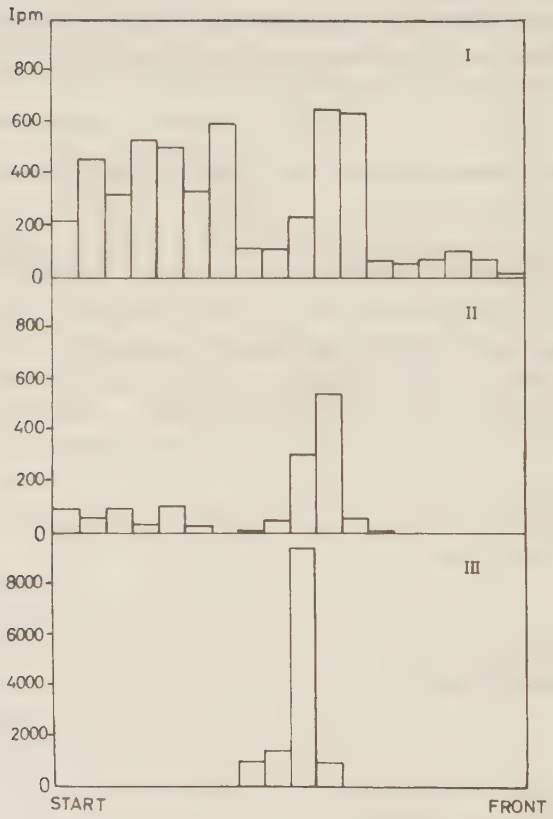


Abb. 29: Isolierung des ^{14}C-1-Leucins aus dem Überstehenden des Fermentationsansatzes.

(I) Radioaktivitätsverteilung auf einem Papierchromatogramm, auf das 0,005 ml sterilfiltrierter Überstand des Fermentationsansatzes aufgetragen worden war.

(II) Radioaktivitätsverteilung von (I) nach vorheriger Behandlung mit Dowex 1 x 8/Formiat.

(III) Radioaktivitätsverteilung nach chromatographischer Trennung eines aliquoten Anteils des Eluats der präparativen Papierchromatographie.

Die Probe wurde auf MN Papier Typ 2261 aufgetragen und in Butanol-Eisessig-Wasser (80-20-20) über Nacht absteigend chromatographiert. Das Chromatogramm wurde luftgetrocknet und vom Start bis zur Front in 18 gleich große Segmente geschnitten. Die Papierstücke wurden in Zählgläschen mit jeweils 10 ml Bray'scher Lösung im Scintillationszähler ausgezählt.

des Ansatzes zu erkennen. Daneben waren in dem Überstehenden weitere radioaktive Verbindungen mit kleinerem R_f-Wert enthalten (Abb. 29 I). Dabei handelte es sich zum größten Teil um Verbindungen mit saurem Charakter, die durch die Behandlung mit einem schwach basischen Ionenaustauscher entfernt werden konnten. Durch eine anschließende präparative papierchromatographische Trennung ließen sich die Fremdaktivitäten völlig abtrennen. Die Zone, die das radioaktive Leucin enthielt, wurde ausgeschnitten und die Aminosäure mit Wasser eluiert. Eine wiederholte Trennung ergab, daß das Leucin nach diesen Reinigungsschritten keine Fremdaktivität mehr enthielt (Abb. 29 III). Das Produkt enthielt allerdings noch erhebliche Mengen Valin, die eine Erniedrigung der spezifischen Aktivität des Leucins verursachten. Die spezifische Aktivität betrug 4 720 Ipm/ µmol und lag damit erheblich unter dem theoretisch berechneten Wert von 20 100 Ipm/ µmol Leucin. Durch wiederholte papierchromatographische Trennungen in verschiedenen Laufmitteln ließ sich schließlich auch das Valin abtrennen (Tab. 14). Nach fünfmaligem Lauf war die theoretische spezifische Aktivität des Leucins erreicht.

5.3. Die Verteilung der Radioaktivität im Leucin

Bei der Verwendung von markierter Essigsäure sollte sich an der Isotopenverteilung erkennen lassen, ob das Leucin aus Valin und Acetat über den bekannten Biosyntheseweg gebildet worden war. Die Carboxylgruppe der Essigsäure sollte das C-Atom 1 des Leucins liefern (siehe auch Abb. 11). Die Verwendung C-1-markierter Essigsäure ermöglicht es, die Beteiligung der zugesetzten Essigsäure schon durch Decarboxylierung des Leucins und Bestimmung

Tab. 14: Die Reinigung des Leucins zu konstanter spezifischer Radioaktivität.

Laufmittel	Ipm in 5 µl	µmol Aminosäure in 5 µl	Ipm/µmol Aminosäure
eingesetztes Rohprodukt	10 600	2,25	4 720
n-Butanol (4 T) Eisessig (1 T) Wasser (1 T)	2 589	0,46	5 630
n-Butanol/wassergesättigt	2 509	0,173	14 500
Pyridin (1 T) Äthylacetat (2 T) Wasser (1 T)	2 241	0,113	19 850
n-Butanol/wassergesättigt	1 201	0,059	20 400
n-Butanol (4 T) Eisessig (1 T) Wasser (1 T)	1 125	0,054	20 800

Die Aminosäurelösung wurde auf MN Papier Typ 2261 aufgetragen und absteigend in dem angegebenen Laufmittel chromatographiert. Die Leucinzone wurde an Hand der Radioaktivität auf dem Chromatogramm lokalisiert, ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde gefriergetrocknet und auf genau 0,300 ml mit Wasser aufgefüllt. Die Radioaktivität in 0,005 ml wurde bestimmt. In weiteren 0,005 ml wurde der Gehalt an Aminosäure nach ROSEN (1957) bestimmt. Die Chromatographie wurde in der angegebenen Weise wiederholt, bis das Verhältnis Ipm/ µmol Aminosäure annähernd konstant blieb.

der Radioaktivität des Kohlendioxyds nachzuweisen.

Aus α-Aminosäuren läßt sich die Carboxylgruppe durch Ninhydrin quantitativ abspalten. Das isolierte Leucin wurde nach der Vorschrift von STRASSMAN et al. (1955a) decarboxyliert. Von 100 % der eingesetzten Radioaktivität wurden 94 % wiedergefunden, wovon sich 90,6 % der gesamten Impulse im abgespaltenen Kohlendioxyd befanden (Tab. 15).

Tab. 15: Die Isotopenverteilung im ausgeschiedenen Leucin.

^{14}C im	Ipm	% der eingesetzten Radioaktivität
Leucin	$1{,}61 \times 10^5$	100
CO_2	$1{,}46 \times 10^5$	90,6
Isovalerylaldehyd	$0{,}01 \times 10^5$	1,5
Rückstand	$0{,}04 \times 10^5$	2,6
Wiedergefunden	$1{,}51 \times 10^5$	94,7

Die Decarboxylierung wurde nach STRASSMAN et al. (1955a) durchgeführt (s. Methoden).

5.4. Nachweis der Ausscheidung von radioaktiv markierten Säuren

Durch die Behandlung des Fermentationsüberstandes mit Dowex 1 x 8/Formiat, innerhalb des unter 5.2. wiedergegebenen Trennungsganges, wurden die neben Leucin während der Fermentation ausgeschiedenen, radioaktiv markierten Säuren abgetrennt. Nach weiterer Aufarbeitung konnten drei, nicht-wasserdampfflüchtige Säuren papierchromatographisch nachgewiesen werden (Abb. 30). Eine Identifizierung dieser Säuren wurde nicht durchgeführt. Der R_f-Wert der am weitesten gewanderten Säure von 0,90 entsprach dem von synthetischer DL-α-Isopropyläpfelsäure (s. Abb. 12).

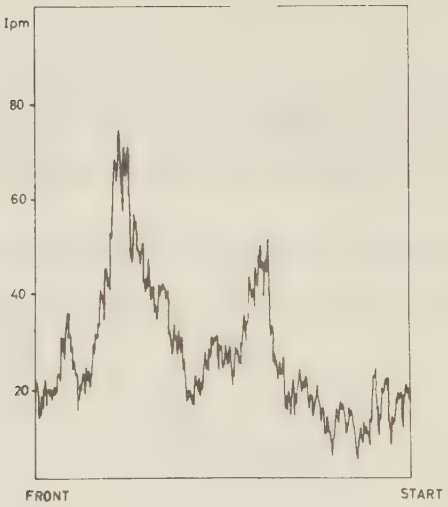


Abb. 30: Der Nachweis von ^{14}C-markierten Säuren im Fermentationsüberstand der Mutante H 16 vi$^-$ 43.

Der Überstand der Fermentation der Mutante auf Valin und ^{14}C-1-Acetat (siehe Abb. 28) wurde mit Dowex 1 x 8/Formiat behandelt. Die neutralen Produkte wurden mit Wasser durchgewaschen, die adsorbierten Säuren anschließend mit 1 N HCl eluiert. Das Eluat von 200 ml wurde unter vermindertem Druck auf 10 ml eingeengt. 0,01 ml wurden auf MN Papier Typ 2261 aufgetragen und aufsteigend in Äther (13 T)-Eisessig (3 T)-Wasser (1 T) entwickelt. Die Lokalisation der Radioaktivität im luftgetrockneten Chromatogramm erfolgte mit dem Papierchromatographen und angeschlossenem Kompensationsschreiber.

5.5. Die Ausscheidung von Leucin durch den Wildtyp Hydrogenomonas H 16

Auch der Wildtyp Hydrogenomonas H 16 war in der Lage, nach Wachstum auf Acetat aus zugesetztem Valin Leucin zu bilden. Da die Biosyntheseenzyme des Leucins beim Wildtyp reprimiert waren, verringerte sich die Leucinbildung. Das zugesetzte Valin bewirkte offenbar nur die Aufhebung der Endproduktthemmung des Leucins auf die IPM-Synthase.

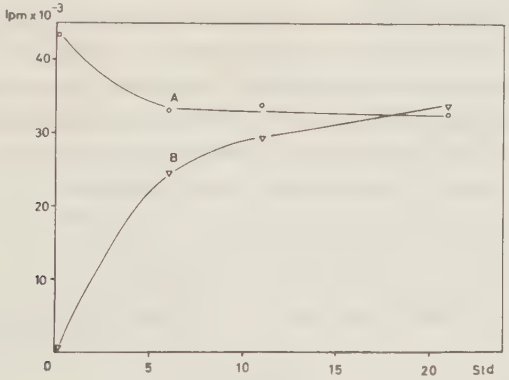


Abb. 31: Die Leucinausscheidung durch Hydrogenomonas H 16 während der Inkubation in einer Valin und Acetat enthaltenden Nährlösung.

H. H 16 wurde nach Wachstum in Acetat-Nährlösung durch Zentrifugation geerntet und in 20 ml einer Lösung aufgenommen, die die in Abb. 28 angegebene Zusammensetzung hatte. Die spez. Aktivität des Acetats betrug 32 300 Ipm/ µmol. Der Zellproteingehalt betrug 2,4 mg/ml.
A) Radioaktivität in 0,01 ml Kulturmedium
B) Radioaktivität in 1 ml Kulturmedium, nach Sterilfiltration, Dowex 1/Formiat Behandlung und Papierchromatographie (MN Typ 2261, Butanol-Eisessig-Wasser (4 T + 2 T + 2 T), aufsteigend in der Leucinposition.

Die Ausscheidung an Leucin betrug 6 % des eingesetzten Valins und war achtmal geringer als bei der Mutante H 16 vi$^-$ 43 unter den gleichen Bedingungen. Der Befund, daß in Gegenwart von Valin von den Zellen des Wildtyps Leucin ausgeschieden wurde, bestätigte den oben (siehe Abschnitt 3.6.) beschriebenen Antagonismus zwischen Leucin und Valin bei der Endprodukthemmung der Leucinbiosynthese.

5.6. Die Ausscheidung von α-Aminobuttersäure durch die Mutante H 16 vi$^-$ 43

Wie in Abschnitt 3.11. beschrieben wurde, ist die Spezifität der α-IPM-Synthase bezüglich der α-Ketosäuren gering. Auch das Enzym aus Hydrogenomonas H 16 setzt mehrere α-Ketosäuren um. Hinweise auf die Unspezifität der übrigen Enzyme der Reaktionskette wurden durch die Bildung von Gärungsalkoholen der Hefe über die Leucinbiosynthesekette erhalten (INGRAHAM und GUYMON 1960, INGRAHAM et al. 1961, WEBB und INGRAHAM 1963, GUYMON 1966). Die Beteiligung der Leucinbiosyntheseenzyme am Abbau von ß-Äthyläpfelsäure wurde durch RABIN et al. (1968) gefunden.

Bei Hydrogenomonas wurde die Frage nach der Unspezifität der gesamten Leucinbiosynthesekette an dem Enzymsystem der Mutante H 16 vi$^-$ 43 untersucht. Durch den Einsatz von ^{14}C-markierter Essigsäure und nicht-markierter Aminosäure mußte die hohe Aktivität der Synthesekette, verbunden mit der Irreversibilität zweier Reaktionsschritte, ein empfindliches System für einen Substratumsatz darstellen.

Bei der Fermentation der unter Valinbegrenzung auf Acetat gewachsenen Mutante mit L-Alanin und ^{14}C-1-Acetat als Substraten ließ sich eine Ausscheidung von radioaktiv markierter α-Aminobuttersäure nachweisen. Die Fermentationsbedingungen des Ansatzes entsprachen den zu Abb. 28 angegebenen; jedoch wurde an Stelle von Valin 2 mg L-Alanin/ml eingesetzt. Der Zellproteingehalt betrug 2,4 mg/ml und die spezifische Aktivität des eingesetzten ^{14}C-1-Acetats 2,1 x 10^4 Ipm/ µmol.

Nach einer 20stündigen Fermentation der Mutante waren von der eingesetzten Aminosäure 1,5 % in die um ein C-Atom verlängerte homologe Aminosäure umgesetzt worden. Die spezifische Aktivität der α-Aminobuttersäure betrug nach mehrfacher papierchromatographischer Reinigung 1,14 x 10^4 Ipm/ µmol. Die Verdünnung der radioaktiven Markierung ist mit der Annahme zu erklären, daß das eingesetzte L-Alanin schnell abgebaut wird und dadurch eine Verdünnung des ^{14}C-1-Acetatpools durch nicht markierte Essigsäure in den Zellen bewirkt wird.

Auf Grund dieses Versuchsergebnisses ist anzunehmen, daß nicht nur die α-IPM-Synthase, sondern auch die übrigen an der Leucinbiosynthese beteiligten Enzyme relativ unspezifisch sind. Außer den Isopropyläpfelsäurederivaten setzten IPM-Isomerase und ß-IPM-Dehydrogenase auch die Methyläpfelsäuren um. Dieser Befund regte weitere Untersuchungen an, bei denen die Unspezifität der Leucinbiosyntheseenzyme zur Synthese weiterer α-Aminosäuren benutzt wurde.

5.7. Die Bildung von Norvalin aus α-Aminobuttersäure durch die Mutante H 16 vi⁻ 43

Wurde die unter Valinmangel auf Acetat angezogene Mutante vi⁻ 43 mit L-α-Aminobuttersäure und ^{14}C-1-Acetat inkubiert, so ließ sich eine Ausscheidung von ^{14}C-1-Norvalin nachweisen. Die eingesetzte α-Aminobuttersäure wurde durch die Mutante in 12 %iger Ausbeute in die homologe Aminosäure umgesetzt und ausgeschieden. Diese Umsetzung ist ein Hinweis darauf, daß die von RABIN et al. (1968) in Pseudomonas aeruginosa gefundene Unspezifität der Leucinbiosyntheseenzyme für ß-Äthyläpfelsäuren auch für Hydrogenomonas H 16 zutrifft.

Die Ergebnisse der Reinigung und Isolierung von ^{14}C-1-Norvalin aus dem Fermentationsansatz sind in Abb. 32 wiedergegeben. Die spezifische Aktivität des isolierten Norvalins betrug nach dreimaliger papierchromatographischer Reinigung 29 400 Ipm/ µmol Norvalin. Die Prüfung der Isotopenverteilung zeigte, daß insgesamt 87,2 % der eingesetzten Impulse im C-Atom 1 der Aminosäure

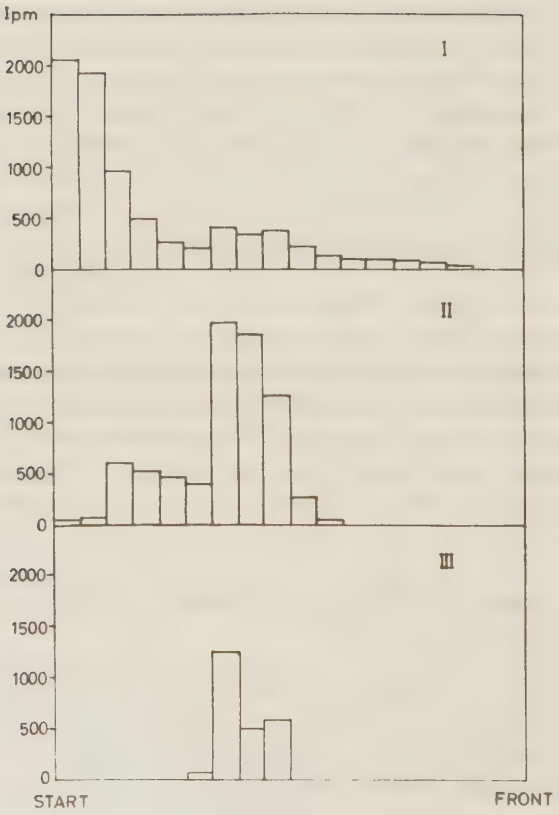


Abb. 32: Die Isolierung des ^{14}C-1-Norvalins aus dem Fermentationsansatz.

Der Fermentationsansatz wurde analog zu Abb. 28 durchgeführt. Der Ansatz enthielt 2 mg L-α-Aminobuttersäure/ml. Die spezifische Aktivität der eingesetzten ^{14}C-1-Essigsäure betrug 35 400 lpm/ µmol. Der Zellproteingehalt des Ansatzes betrug 2,8 mg/ml. Es wurde 20 Std. bei 30°C inkubiert.
Die Radioaktivitätsverteilung auf den Papierchromatogrammen wurde wie in Abb. 29 angegeben.

(I) in 0,01 ml Fermentationsüberstand
(II) in einem aliquoten Anteil des Überstehenden nach Dowex 1 x 8/Formiat-Behandlung und
(III) in einem aliquoten Anteil des Eluats der präparativen Papierchromatographie.

lokalisiert waren. Insgesamt wurden 91,3 % der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden.

Tab. 16: Die Isotopenverteilung im ^{14}C-Norvalin.

Radioaktivität in	Ipm	% der eingesetzten Impulse
Norvalin	$2,84 \times 10^4$	100
CO_2	$2,4 \times 10^4$	37,2
Butyraldehyd	$0,05 \times 10^4$	1,7
Rückstand	$0,08 \times 10^4$	2,8
Wiedergefunden	$2,53 \times 10^4$	91,7

Die Decarboxylierung der Aminosäure wurde nach STRASSMAN et al. (1955a) durchgeführt (siehe Methoden).

5.8. Die Bildung von Norleucin aus Norvalin durch die Mutante H 16 vi$^-$ 43

Wurde die unter Valinmangel auf Acetat angezogene Mutante mit DL-Norvalin und ^{14}C-1-Acetat inkubiert, so wurde radioaktivmarkiertes Norleucin ausgeschieden. In einem analog zu Abb. 28 durchgeführten Versuch mit 4 mg DL-Norvalin/ml und einer spezifischen Aktivität des eingesetzten Acetats von 32 600 Ipm/ µmol, bei einem Zellproteingehalt von 2,4 mg/ml, wurden in 20 Std. 14 % der eingesetzten L-Form des Norvalins umgesetzt und als Norleucin ausgeschieden. Die Radioaktivitätsverteilung nach dem ersten Reinigungsschritt des Fermentationsüberstandes auf einem Papierchromatogramm ist in Abb. 33 wiedergegeben. Nach mehrfacher

papierchromatographischer Reinigung betrug die spezifische Aktivität des ^{14}C-1-Norleucins 33 100 Ipm/ µmol.

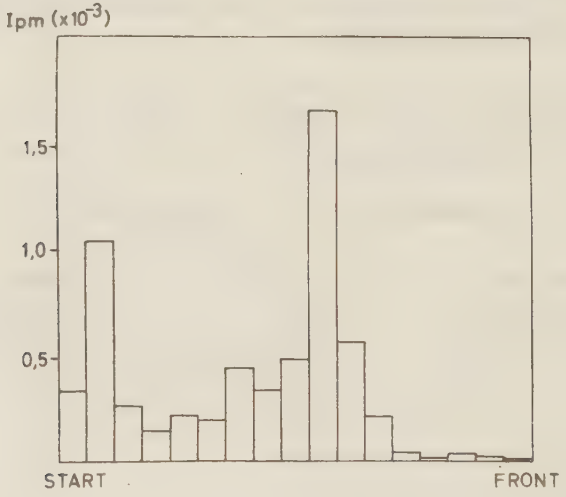


Abb. 33: Radioaktives Norleucin in einem Fermentationsansatz der Mutante H 16 vi^{-} 43, der Norvalin und ^{14}C-1-Acetat enthielt.

Der Fermentationsansatz hatte die in Abb. 28 angegebene Zusammensetzung. Es wurden 4 mg DL-Norleucin/ml, 2,4 mg Zellprotein/ml und ^{14}C-1-Acetat mit einer spezifischen Aktivität von 3,2 x 10^4 Ipm/ µmol zugegeben. Die Abbildung zeigt die Radioaktivitätsverteilung auf dem entwickelten Papierchromatogramm nach Auftragung eines aliquoten Teiles des sterilfiltrierten, mit Dowex 1 x 8/Formiat behandelten Fermentationsüberstandes. Die Bestimmung der Radioaktivität wurde wie in Abb. 29 durchgeführt.

DISKUSSION

I) Antimetabolitwirkung und Antimetabolitresistenz bei Mikroorganismen

Unter den natürlichen Aminosäuren, von denen weit über hundert bekannt sind (FOWDEN et al. 1967) und der noch erheblich größeren Anzahl synthetischer α-Aminosäuren gibt es viele, die eine hohe Strukturähnlichkeit mit einer der zwanzig gewöhnlichen Proteinaminosäuren aufweisen. Die Grundstruktur sowie physikalische und chemische Eigenschaften der isosteren Aminosäuren unterscheiden sich nur wenig von den Proteinaminosäuren, obwohl sie andere Elemente oder Substituenten enthalten (DITTMER 1950). So kann in den längerkettigen aliphatischen Proteinaminosäuren eine Methylengruppe durch Sauerstoff, Schwefel oder eine Methingruppe, in den aromatischen Aminosäuren die Phenylgruppe durch die Thienyl-, Furyl- oder Thiazolylgruppe ersetzt werden, ohne daß die Grundstruktur der Proteinaminosäure stark verändert wird (RICHMOND 1962). Darüber hinaus können für alle funktionellen Gruppen der Aminosäuren isostere Substituenten eingebaut werden.

Die Fluormethylderivate wurde von BROCKWAY (1937) untersucht. Er fand, daß die Substitution eines Wasserstoffatoms in der Methylgruppe durch ein Fluoratom eine nur geringe Veränderung der Molekülgröße bewirkte. Die stabile Trifluormethylgruppe wurde als Substituent in verschiedene Aminosäuren eingebaut (WALBORSKY et al. 1955). Das 5',5',5'-Trifluorleucin wurde erstmals von LONCRINI (1956) synthetisiert. Die ω-Trifluormethylderivate der natürlichen Aminosäuren erwiesen sich als starke Hemmstoffe für Escherichia coli. Die Hemmwirkung ließ sich durch Verabreichung des natürlichen Metaboliten spezifisch aufheben (WALBORSKY et al. 1955). Hinsichtlich ihrer Eigenschaften waren die Trifluoraminosäuren den natürlichen Aminosäuren sehr ähnlich, obgleich der pK-Wert durch den starken induktiven Effekt der Trifluormethylgruppe verändert war (WALBORSKY und LANG, 1956).

Das klassische Beispiel der Wirkung von strukturanalogen Aminosäuren auf den Stoffwechsel von Mikroorganismen sind die Sulfo-

namide. Die bacteriostatische Wirkung dieser Verbindungen wurde schon lange chemotherapeutisch angewandt, bevor WOODS (1940) erkannte, daß die Hemmwirkung auf einem spezifischen Antagonismus zur p-Aminobenzoesäure beruhte. Der Mechanismus der Hemmung wurde erst von BROWN (1962) geklärt. Er fand, daß der Einbau der p-Aminobenzoesäure in die Folsäure durch die Sulfonamide kompetetiv gehemmt wird.

Die Aufhebung der bacteriostatischen Wirkung des Antimetaboliten durch den natürlichen Metaboliten ist charakteristisch für einen kompetetiven Angriffsmechanismus. Im Stoffwechsel dienen die Aminosäuren nicht nur als Baustein für die Proteinsynthese, sondern erfüllen auch verschiedene Regulationsfunktionen. Nach NEIDHARDT (1966) regulieren die Aminosäuren bzw. die jeweilige Aminoacyl-t-RNS die Aminosäurebiosynthese durch Endprodukthemmung und Repression die Katabolitrepression, die RNS-Synthese, die DNS-Synthese und die Protein-Synthese. Die vielfältigen Funktionen erfordern spezifische Erkennungsmechanismen. Die hohe Ähnlichkeit von den Antimetaboliten mit den natürlichen Metaboliten vermag jedoch einige Erkennungsstellen zu täuschen, und so gewinnen die Antimetabolite ihre physiologische Wirksamkeit. Die Unfähigkeit alle Funktionen des Metaboliten zu übernehmen, führt schließlich zur Blockierung des Wachstums.

Durch eine Veränderung im jeweiligen Angriffspunkt des Antimetaboliten kann eine Unempfindlichkeit der Zelle verursacht werden. MOYED (1964) unterscheidet vier verschiedene Gruppen antimetabolit-resistenter Mutanten. Danach kann die Resistenz a) durch eine defekte Aufnahme in die Zelle, b) durch einen bevorzugten Abbau, c) durch eine defekte Regulation der Biosynthese des Metaboliten und d) durch einen defekten Einbau des Antimetaboliten in das Zellprotein verursacht werden.

Eine defekte Aufnahme des Antimetaboliten wurde bei einer D-Serin resistenten Mutante von Escherichia coli gefunden (SCHWARTZ et al. 1959). Die Mutante hatte die Fähigkeit verloren, D-Serin und Glycin in der Zelle anzuhäufen. Canavanin-resistente Mutanten von Escherichia coli waren unfähig, Arginin und Canavanin

in der Zelle zu akkumulieren (MAAS 1965).

Der Abbau von Antimetaboliten in Mikroorganismen ist in verschiedenen Fällen nachgewiesen und untersucht worden, die Bedeutung für die Resistenz von Mutanten ist dagegen seltener untersucht worden. HALL et al. (1960) fanden, daß 5-Methyltryptophan durch die Tryptophanase abgebaut werden kann. Thioprolin wird durch Escherichia coli oxydiert(UNGER und DeMOSS, 1966).

Die vorgelegten Untersuchungen an Hydrogenomonas H 16 haben gezeigt, daß der Wildtyp unter bestimmten Bedingungen und auch eine trifluorleucin-resistente Mutante in der Lage sind, den Antimetaboliten Trifluorleucin in geringem Ausmaß zu oxydieren. Der einleitende Schritt des Abbaues, die Transaminierung mit α-Ketoglutarsäure wird durch zellfreie Extrakte in hoher Aktivität katalysiert. Daß der Abbau des Antimetaboliten direkt die Resistenz von Mutanten verursachte, wurde von MAW (1966) an einer äthionin-resistenten Mutante von Saccharomyces cerevisiae gefunden.

Am häufigsten sind unter antimetabolit-unempfindlichen Mutanten diejenigen, die eine veränderte Regulation in der Bildung des Metaboliten besitzen. Auf Grund der kompetetiven Beziehung zwischen Antimetabolit und Metabolit ermöglicht die Überproduktion des Metaboliten das Wachstum der Zelle.

Eine Fähigkeit zur Erhöhung der Syntheseleistung besitzt auch der Wildtyp. Durch die Ausschöpfung der Syntheseleistungsreserven ist der Wildtyp zur Adaptation an manche Antimetabolite fähig. MOYED (1960b) bezeichnete die Erscheinung als "induced phenotypic resistance". Er fand, daß Escherichia coli W nach Zusatz von Thiazolalanin zunächst das Wachstum einstellte. Nach einer lag-Phase, in der eine Derepression der Biosyntheseenzyme des Histidins stattfand, setzte das Wachstum der Bakterienpopulation wieder ein. Charakteristisch für die Adaptation ist die Tatsache, daß der Wildtyp nach längerem Wachstum ohne Antimetabolitzusatz wieder gegenüber den Antimetaboliten empfindlich wird. Die induzierte phänotypische Resistenz wurde auch bei

Salmonella typhimurium nach α-Methylhistidinzusatz (SCHLESINGER und MAGASANIK 1964) und bei Mycobacterium pellegrino nach Zugabe von Valin, einem Antimetaboliten des Isoleucins, gefunden (HORVATH et al. 1967).

Mutanten mit genetisch bedingter Derepression der Biosyntheseenzyme sind ohne lag-Phase gegen Antimetabolite resistent. Die Veränderung dieser Mutanten kann auf ein defektes Operator- oder Regulatorgen zurückgeführt werden. Konstitutiv dereprimierte Mutanten sind fast gegen alle bekannten Aminosäureantimetabolite isoliert worden. Unter den dereprimierten Mutanten von Salmonella typhimurium, die gegen 1,2,4-Triazolalanin resistent geworden waren, sind bisher sechs verschiedene Regulationsgene identifiziert worden, deren Defekt die Derepression auslöste (AMES und HARTMANN 1963, LEVIN und HARTMANN 1963, ANTON 1968).

Durch die Ausschaltung der Endproduktregulation ist ebenfalls eine Antimetabolitresistenz möglich. Die Resistenzmutation ist sehr häufig, wenn der Antimetabolit seine Wirkung auf Grund einer "false feedback-inhibition" (MOYED 1960a) ausübt. So sind die gegenüber 2-Thiazolalanin resistenten Mutanten hauptsächlich in dem Enzym effektorunempfindlich geworden, das in dem Wildtyp durch Histidin und Thiazolalanin hemmbar ist (MOYED 1961, MARTIN 1963, SHEPPARD und HARTMANN 1963). Valinresistente Mutanten von Escherichia coli besaßen eine durch Valin nicht mehr hemmbare AHS-Synthase (LEAVITT und UMBARGER 1962). Eine Mutante, bei der der vorher negative allosterische Effektor sogar förderte, isolierten NESTER und COATS (1967) bei Bacillus subtilis, dessen Phrephensäure-Dehydrogenase nicht nur nicht durch Phenylalanin und ß-2-Thienylalanin gehemmt wurde, sondern durch zugesetztes Phenylalanin sogar gefördert wurde.

FANGMAN und NEIDHARDT (1964) fanden, daß auch die Veränderung der Fähigkeit zum Einbau eines Antimetaboliten in das Zellprotein zur Resistenz führen kann. Eine p-fluorphenylalanin-resistente Mutante von Escherichia coli war nicht mehr in der Lage, den Antimetaboliten zu aktivieren und an die entsprechende t-RNS zu koppeln. Der Defekt der Phenylalanyl-t-RNS-Synthetase

war spezifisch für p-Fluorphenylalanin. Phenylalanin und die m-Fluor- bzw. o-Fluorderivate des Phenylalanins konnten noch aktiviert werden.

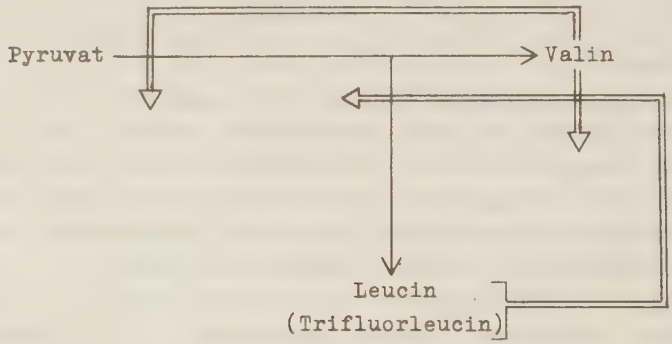
Die Trifluorleucinwirkung ist bisher bei Escherichia coli, Salmonella typhimurium und Neurospora crassa untersucht worden (RENNERT und ANKER 1963, CALVO und UMBARGER 1964, WEBSTER und GROSS 1965). Trifluorleucin hemmt das Wachstum dieser Mikroorganismen und hat darüber hinaus auch in höheren Organismen eine cytostatische Wirkung(RENNERT und ANKER 1964). Eine phänotypische Resistenz von leucinauxotrophen Mutanten gegen Trifluorleucin zeigten RENNERT und ANKER (1963) bei Escherichia coli. Durch eine allmähliche Erhöhung des Trifluorleucin:Leucin-Verhältnisses in kontinuierlicher Kultur konnte der Stamm völlig an den Antimetaboliten adaptiert werden, so daß aus dem Protein der Mutante an Stelle des Leucins Trifluorleucin isoliert werden konnte. Die Wirkung als Hemmstoff der IPM-Synthase, des allosterisch empfindlichen Enzyms der Leucinbiosynthese, wurde von UMBARGER et al. (1965) bei Salmonella typhimurium gefunden. Gegen Trifluorleucin resistente Mutanten wurden von CALVO und UMBARGER (1964) bei Salmonella typhimurium isoliert. Die Mutanten besaßen entweder einen dereprimierten Leucinbiosyntheseweg oder waren in dem regulatorisch empfindlichen Enzym des Leucinweges, der IPM-Synthase, gegen Leucin und Trifluorleucin unempfindlich geworden. Bei Neurospora crassa isolierten WEBSTER und GROSS (1965) Mutanten, die eine leucinunempfindliche IPM-Synthase besaßen, mit Hilfe des Antimetaboliten.

Von Hydrogenomonas H 16 ließen sich durch Trifluorleucin außer den beiden bekannten Resistenzmutanten-Typen mit veränderter Regulation der Leucinbiosynthese weitere Mutanten isolieren, deren Regulation des Valin-Isoleucinbiosyntheseweges defekt war.

Verschiedene dieser Mutanten besaßen eine konstitutiv derepremierte AHS-Synthase. Eine resistente Mutante hatte eine gegen Valin unempfindlich gewordene AHS-Synthase. Die Trifluorleucinresistenz der letztgenannten Mutante konnte durch die, nach dem Verfahren von CHANGEUX (1963) vorgenommene Isolierung von drei

weiteren Mutanten mit einer gegenüber Valin unempfindlichen AHS-Synthase bestätigt werden. Diese Mutanten waren ebenfalls trifluorleucin-resistent.

Wachstumsversuche mit Trifluorleucin, Fütterungsversuche zur Aufhebung der Trifluorleucinhemmung und die allosterische Hemmung der Leucinbiosynthese zeigten, daß Trifluorleucin auch bei Hydrogenomonas ein spezifischer Antagonist des Leucins ist. In den resistenten Mutanten erfolgt die Verknüpfung der Valinüberproduktion mit der Trifluorleucinresistenz über die gemeinsame Regulation der α-IPM-Synthase durch Valin und Leucin (bzw. Trifluorleucin), die im folgenden Schema wiedergegeben ist:



Ein einfacher Strich deutet die Biosynthesekette an, während der doppelte Strich die Funktion des Endproduktes als allosterischer Effektor wiedergibt. Die Hemmung von Reaktionen ist durch sich kreuzende Linien herausgestellt.

Der Nachweis des aktivitätssteigernden Einflusses von Valin auf die durch L-Leucin (bzw. Trifluorleucin) gehemmte α-IPM-Synthase in vitro wurde durch die Isolierung der neuen trifluorleucin-resistenten Mutanten bei Hydrogenomonas H 16 in vivo bestätigt. Dieser Mechanismus ist in Escherichia coli K 12 und in Pseudomonas aeruginosa nicht vorhanden. Bei Micrococcus denitrificans ist die Wirkung des Valins als Antagonist des Leucins noch stärker ausgeprägt als bei Hydrogenomonas.

Eine ähnliche Wirkung des Valins wurde auf die Threonin-Desaminase bei verschiedenen Mikroorganismen gefunden. FREUNDLICH und UMBARGER (1963) und CHANGEUX (1963) zeigten, daß bei Salmonella typhimurium und Escherichia coli die durch L-Isoleucin gehemmte Threonin-Desaminase durch zugesetztes Valin wieder aktiv wurde. An Hefe wurde der Effekt von CENNAMO et al. (1964) gefunden. Nach REH (1967) wird auch die Threonin-Desaminase bei Hydrogenomonas H 16 durch Valin reaktiviert.

II) Die Aminosäureausscheidung durch regulations-defekte Mutanten

Phänotypischer Ausdruck von regulations-defekten Mutanten kann die Akkumulierung von Aminosäuren im Nährmedium sein. Die Aminosäureausscheidung wurde von ADELBERG (1958) zur direkten Isolierung solcher Mutanten eingesetzt. Die Metabolitausscheidung durch antimetabolit-resistente Mutanten wurde an sulfonamid-resistenten Stämmen von Staphylococcus aureus gefunden, die p-Aminobenzoesäure akkumulierten (LANDY et al. 1943, OAKBERG und LURIA 1947). Von SCHERR und RAFELSON (1962, 1963a, 1963b, 1966) wurde die Selektion von Mutanten mit erhöhter Metabolitakkumulation durch die Antimetabolittechnik zur Erhöhung von Fermentationsausbeuten systematisch angewendet. Seither sind eine Vielzahl von regulationsdefekten Mutanten nach dieser Methode isoliert worden. Nach DAVIS et al. (1967) kommt es bei antimetabolit-resistenten Mutanten bevorzugt dann zu einer Ausscheidung des Metaboliten, wenn die Endprodukthemmung aufgehoben worden ist. Eine fehlende oder unvollständige Endprodukthemmung liegt oft auch in den Wildtypformen von Bakterien vor, die zur Aminosäureausscheidung befähigt sind. So wird die Valinbildung durch prototrophe Wildtypstämme nach UDAKA und KINOSHITA (1960) durch eine valin-unempfindliche AHS-Synthase verursacht. Eine Aminosäureausscheidung durch Wildtypstämme ist auch durch eine Umgehung der Endprodukthemmung möglich, wenn spezielle Vorläufer eingesetzt werden (DULANEY 1966). Serratia marcescens bildet beispielsweise aus D-Threonin in hoher Ausbeute L-Isoleucin, da die Threonindesaminase dieses Organismus nicht durch Isoleucin

gehemmt wird (KISUMI et al. 1964).

Aminosäurefermentationen mit antimetabolit-resistenten Mutanten haben noch keine technische Bedeutung. Da bei diesen Mutanten immer nur ein einziger Regulationsmechanismus aufgehoben wird, sind sie den auxotrophen Mutanten unterlegen, in denen durch Anzucht unter Wuchsstoffbegrenzung die Repression und die Endproduktheмmung in einem Schritt aufgehoben werden kann. So werden nach diesem Prinzip bestimmte Aminosäuren schon technisch hergestellt, wie Diaminopimelinsäure durch lysin-auxotrophe und Ornithin durch citrullin-auxotrophe Mutanten (CASIDA 1956, KINOSHITA et al. 1957). Zur Steigerung der Ausscheidung durch antimetabolit-resistente Mutante sind weitere genetische Manipulationen notwendig, wie sie etwa von CALVO und CALVO (1967) durchgeführt wurden. Die Autoren transduzierten den Chromosomenabschnitt, der die Information für die Bildung einer nicht durch L-Leucin hemmbaren IPM-Synthase trug, aus einer trifluorleucin-resistenten Mutante in einen anderen trifluorleucin-resistenten Stamm mit konstitutiv dereprimierter IPM-Synthase. Die erhaltene Doppelmutante schied 51 % der angebotenen Glucose in Form von Leucin aus der Zelle aus. Eine Erhöhung der Aminosäureausscheidung kann auch durch eine mehrfache Resistenz eines Stammes gegen verschiedene Antimetabolite erreicht werden (KARLSTRÖM 1965, BANDIERA et al. 1967).

Unter den bei Hydrogenomonas H 16 isolierten, gegenüber Trifluorleucin resistenten Mutanten schieden nur diejenigen, deren AHS-Synthase dereprimiert gebildet wurde, nennenswerte Mengen an Aminosäuren in das Nährmedium aus. Unter chemolithotrophen Wachstumsbedingungen war überhaupt keine Ausscheidung festzustellen. Bei organotrophem Wachstum wurden bis zu 270 µg/ml Valin, 65 µg/ml Leucin und wenig Isoleucin (bzw. ein Vorläufer des Isoleucins) ausgeschieden. Die Akkumulierung von Valin und Isoleucin ist der Doppelfunktion der AHS-Synthase in der Valin- und Isoleucinbiosynthese zuzuschreiben (RADAKRISHNAN und SNELL 1960, LEAVITT und UMBARGER 1961), die auch bei H 16 durch die gleichzeitige Auxotrophie von Defektmutanten des Biosyntheseweges für Valin

und Isoleucin nachgewiesen wurde (REH 1967). Die Leucinausscheidung wird nach den eigenen Untersuchungen durch die Daueraktivierung der IPM-Synthase, des ersten, allosterisch empfindlichen Leucinbiosyntheseenzyms, verursacht. Das durch die Derepression der AHS-Synthase akkumulierte Valin verhindert die Hemmwirkung des Leucins auf seine eigene Biosynthese. Von den beiden Mutantengruppen mit veränderter Regulation der Valinbiosynthese schieden diejenigen mit konstitutiv dereprimierter AHS-Synthase die größten Mengen Valin aus. Es wurde verschiedentlich herausgestellt, daß in erster Linie Mutanten mit endprodukt-unempfindlichen Biosyntheseenzymen die größten Mengen an Endprodukt bilden (DAVIS et al. 1967). Daß im Gegensatz dazu bei Hydrogenomonas die dereprimierten Mutanten des Valinbiosyntheseweges die größeren Mengen Endprodukt ausscheiden, kann damit erklärt werden, daß die AHS-Synthase als endprodukt-empfindliches Enzym schon beim Wildtyp durch Valin nur unvollständig gehemmt wird. REH (1967) fand, daß in Hydrogenomonas das Enzym sowohl in vitro (im Rohextrakt) als auch in situ (in toluolbehandelten Zellen) ebenso wie bei vielen anderen untersuchten Mikroorganismen durch zugesetztes Valin nur schwach (bis zu 60 %) gehemmt wird. In eigenen Untersuchungen wurde, unter veränderten Testbedingungen, festgestellt, daß die AHS-Synthase der Mutante TFL^r S 14 zu 80 % durch Valin hemmbar war.

Die Höhe der Valinausscheidung war vom Zeitpunkt des Aberntens, der Wahl der C-Quelle, der Begasung und der Temperatur abhängig. Unter organotrophen Anzuchtbedingungen wurde in den ausscheidenden Mutanten gleichzeitig der Abbau der betreffenden Aminosäuren induziert. Nach Ende des Wachstums in statischer Kultur waren die akkumulierten Aminosäuren vollständig verwertet worden. Der Abbau konnte durch die Begasung der Ansätze mit Wasserstoff verhindert werden. Molekularer Wasserstoff, der für Hydrogenomonas ein energieliefernedes Substrat ist, besitzt eine ausgeprägte Katabolitrepressionswirkung auf die Verwertung verschiedener organischer C-Quellen (GOTTSCHALK 1965, BLACKOLB 1967). Indem die Repression der Verwertung von Aminosäuren übt der Wasserstoff einen deutlich konservierenden Einfluß auf die im Nährmedium akkumulierten Aminosäuren aus.

Die Abhängigkeit der Valinausscheidung von der Art der C-Quelle wird durch die geringe Substrataffinität der AHS-Synthase für Pyruvat verständlich. Im Rohextrakt der Mutante H 16 TFL^r S 14 wurde der K_m-Wert für Pyruvat mit 5×10^{-2}M bestimmt. Die zweieinhalbfache Erhöhung der Valinausscheidung durch die Verwendung von Pyruvat und Laktat gegenüber Fructose und Gluconat als C-Quelle wird durch die wesentlich bessere Substratsättigung durch die beiden erstgenannten Substrate verursacht. Darüber hinaus fanden VARGA und HORVATH (1967) bei Pseudomonas aeruginosa, daß durch den Einsatz von Pyruvat als C-Quelle der valin-unempfindliche Anteil der AHS-Synthase in den Zellen erheblich zunahm. Eventuell trägt dieser Effekt auch bei Hydrogenomonas zur Steigerung der Valinausscheidung bei Wachstum auf Pyruvat und Laktat bei.

III) Die Leucinbiosynthese in Hydrogenomonas

Der Biosyntheseweg des Leucins wurde von STRASSMAN et al. (1955, 1956) nach Isotopenverteilungsexperimenten formuliert und konnte durch die Isolierung von Zwischenprodukten und den Nachweis der entsprechenden Enzyme bei verschiedenen Mikroorganismen bestätigt werden (CALVO et al. 1962, JUNGWIRTH et al. 1963, MARTIN et al. 1962, GROSS et al. 1962, STRASSMAN und CECI 1963). Jedoch gibt es Hinweise, daß in einigen Pansenbakterien ein abweichender Weg der Leucinsynthese beschritten wird. Ruminococcus flavefaciens, Bacteroides ruminicula und Peptostreptococcus elsdenii bauen ^{14}C-markierte Isovaleriansäure in das Zellprotein ein. Die Radioaktivität konnte nach Säurehydrolyse des Proteins vollständig im Leucin wiedergefunden werden (ALLISON et al. 1962, ALLISON et al. 1966).

Theoretisch ist ein zweiter Biosyntheseweg des Leucins denkbar. Nach Kondensation von Isovaleryl-CoA mit Glyoxylsäure könnte die ß-Isopropyläpfelsäure gebildet werden, die das letzte Intermediärprodukt im herkömmlichen Biosyntheseweg vor dem Ketoleucin ist. Das erforderliche Enzym, das ß-Isopropyläpfelsäure zu Ketoleucin umsetzt, die ß-IPM-Dehydrogenase, ist in geringer Akti-

vität in den oben genannten Organismen vorhanden (ALLISON et al. 1966). Enzymaktivitäten, die eine Kondensation zwischen höheren Acyl-CoA-Verbindungen und Glyoxylat katalysieren, konnten in verschiedenen Bakterien nachgewiesen werden. Die ß-Äthylmalat-Synthase wurde in zellfreien Extrakten von Pseudomonas aeruginosa nach Wachstum auf Buttersäure gefunden (RABIN et al. 1963). Ein Valeryl-CoA zu ß-n-Propyläpfelsäure umsetzendes Enzym wurde in zellfreien Extrakten von Escherichia coli nach Wachstum auf Valeriansäure gefunden (IMAI et al. 1963).

Unter achtzehn geprüften auxotrophen Mutanten von Hydrogenomonas, die leucinbedürftig waren, konnte keine Mutante gefunden werden, die mit synthetischer DL-α-Isopropyläpfelsäure ihre Wuchsstoffansprüche zu befriedigen vermocht hätte. Außerdem konnte in Kreuzfütterungsexperimenten nur eine einheitliche Gruppe bestimmt werden, die sich untereinander nicht fütterte. Wenn bei Hydrogenomonas ein Nebenweg der Leucinsynthese in der oben beschriebenen Weise vorhanden ist, würde die Auffindung einer einzigen Gruppe von defekten leucinauxotrophen Mutanten verständlich. Dann würden bis auf die bezüglich der ß-IPM-Dehydrogenase defekten Mutanten alle trotz des Blocks in geringem Umfang wachsen. Bei den Mutanten mit defekter α-IPM-Synthase oder defekter IPM-Isomerase würde die Leucinsynthese durch die Kondensation von Isovaleryl-Coenzym A und Glyoxylat zu ß-Isopropyläpfelsäure möglich sein. Wahrscheinlich kann jedoch die Tatsache, daß unter den leucinbedürftigen Mutanten von Hydrogenomonas H 16 kein Syntrophie beobachtet werden konnte, einfacher erklärt werden. Nach JUNGWIRTH et al. (1963) zeigen auch leucinauxotrophe Mutanten von Salmonella typhimurium und Neurospora crassa mit verschieden defekten Enzymen keine Kreuzfütterung. Bei S. typhimurium war nur unterhalb pH 6,0 eine schwache Fütterung zu beobachten. Die Intermediärprodukte des Leucinweges wurden jedoch durch alle Mutanten auch bei neutralem pH-Wert ausgeschieden. Es muß daher angenommen werden, daß die Aufnahme der α- und ß-Isopropyläpfelsäure in die Zellen von verschiedenen Mikroorganismen stark gehindert ist. Die Akkumulierung dieser Intermediärprodukte wird nicht durch das Wachstum von ent-

sprechenden leucinauxotrophen Mutanten angezeigt.

Das Schlüsselenzym des herkömmlichen Leucinbiosyntheseweges ist in Hydrogenomonas vorhanden. Dies geht aus dem fluormetrischen Nachweis der aus α-Ketoisovaleriansäure und Acetyl-CoA gebildeten Isopropyläpfelsäure hervor. Die üblichen Aktivitätsbestimmungen für die α-IPM-Synthase erfassen die Umsetzung des Substrates Acetyl-CoA. Die freigesetzten SH-Gruppen des Coenzyms A wurden von STRASSMAN und CECI (1963) und WEBSTER und GROSS (1965) mit Nitroprussidnatrium, 3-Carboxy-4-nitrophenyldisulfid nach ELLMAN (1959) oder N-Äthylmaleimid nach ROBERTS und ROUSER (1958) bestimmt. In Rohextrakten von Hydrogenomonas H 16 erfolgte aber eine hohe unspezifische Freisetzung von SH-Gruppen aus dem Acetyl-CoA, die durch das an der Synthese von Poly-ß-hydroxybuttersäure beteiligte Enzymsystem (SCHLEGEL 1961, SCHINDLER 1964) verursacht werden könnte. Daher wurde zur Erfassung des Produktes der Reaktion die Isopropyläpfelsäure fluorometrisch in einem veränderten Test nach STRASSMAN und CECI (1963) bestimmt.

Neben der allosterischen Empfindlichkeit der α-IPM-Synthase war besonders die Substratunspezifität interessant. Die Fähigkeit der α-IPM-Synthase, mit α-Ketosäuren unspezifisch zu reagieren, ist bei allen daraufhin untersuchten Organismen gefunden worden (CALVO et al. 1962, KOLHAW und UMBARGER 1965, WEBSTER und GROSS 1965, STRASSMAN und CECI 1964, RABIN et al. 1968). Auch bei Hydrogenomonas konnte die Unspezifität der α-IPM-Synthase für Pyruvat, Ketobutyrat, Keto-n-valerat und Keto-n-caproat nachgewiesen werden. Eine geringe Reaktion scheint sogar mit Glyoxylsäure stattzufinden, wie die 17 %ige Hemmung der Äpfelsäurebildung im Rohextrakt aus Glyoxylat und Acetyl-CoA durch L-Leucin zeigt. Die Unspezifität der α-IPM-Synthase für α-Ketosäuren führte zu einer einheitlichen Nomenklatur der Intermediärprodukte der Leucinbiosynthese und unspezifischer Kondensationsprodukte der α-IPM-Synthase, die jetzt nach dem Vorschlag von STRASSMAN und CECI (1963) als Derivate der Äpfelsäure bezeichnet werden. Das Reaktionsprodukt aus Pyruvat und Acetyl-CoA ist demnach das α-Methylmalat (= Citramalat). Diese Reaktion, die

von GRAY und KORNBERG (1960) bei Pseudomonas ovalis entdeckt wurde, wird zumindest teilweise sicherlich durch die α-IPM-Synthase katalysiert. Eine leichte Entscheidung über die Beteiligung der α-IPM-Synthase ist durch die Hemmbarkeit dieses Enzyms durch L-Leucin möglich.

Hinweise auf eine Unspezifität der weiteren an der Leucinbiosynthese beteiligten Enzyme liegen seit längerer Zeit vor. Die Untersuchung der Fuselölbildung während der Hefegärung zeigte, daß außer dem Abbau exogener Aminosäuren zu den Fuselölen, der von EHRLICH (1907) und NEUBAUER und FROMHERZ (1911) gefunden wurde, andere Mechanismen an der Bildung der höheren Gärungsalkohole beteiligt sein müssen. INGRAHAM und GUYMON (1960), INGRAHAM et al. (1961), WEBB und INGRAHAM (1963) und GUYMON (1966) schlossen ausMarkierungsexperimenten und Fermentationsversuchen an aminosäure-auxotrophen Mutanten von Saccharomyces cerevisiae, daß an der Bildung von n-Propanol, n-Butanol, n-Amylalkohol und n-Hexylalkohol eine Reaktionsfolge beteiligt sein mußte, die über die Leucinbiosyntheseenzyme führte. Der einleitende Schritt der Bildung dieser Alkohole ist die Kondensation von α-Ketosäuren mit Acetyl-Coenzym A. Die weitere Reaktion führt zu den um ein C-Atom verlängerten α-Ketosäuren, die wieder mit Acetyl-CoA kondensieren können oder nach Decarboxylierung zum Aldehyd und dessen nachfolgender Reduktion zum entsprechenden Gärungsalkohol umgesetzt werden.

Die Unspezifität der IPM-Dehydrogenase bei dem Abbau von DL-erythro-ß-Äthyläpfelsäure zu α-Keto-n-valeriansäure wiesen RABIN et al. (1968) bei Pseudomonas aeruginosa nach. In zellfreien Extrakten erfolgte auch eine Isomerisierung zu α-Äthyläpfelsäure; auch eingesetzte Äthylmaleinsäure wurde umgesetzt. Es ließen sich α- und ß-Äthyläpfelsäure nachweisen. Die letztere Reaktion zeigt die Unspezifität der IPM-Isomerase in Pseudomonas aeruginosa.

Bei Hydrogenomonas H 16 konnte die Unspezifität durch die Ausscheidung von Aminosäuren nachgewiesen werden. Intakte Zellen

der Mutante H 16 vi⁻ 43 waren in der Lage, aus L-Alanin α-Aminobuttersäure, aus L-α-Aminobuttersäure Norvalin und aus DL-Norvalin Norleucin zu bilden. Der Einbau von ^{14}C-1-Acetat in die Aminosäuren machte die Beteiligung der Leucinbiosyntheseenzyme an den Reaktionen wahrscheinlich. Der Reaktionszyklus, der die Aminosäuren in die um ein C-Atom verlängerten homologen Aminosäuren überführt, ist der Synthese der höheren Fettsäuren sehr ähnlich (Abb. 34). Der "Leucinzyklus" führt zur Synthese einer um ein C-Atom verlängerten α-Ketosäure. Während der Reaktionsfolge wird die Carboxylgruppe der eingesetzten α-Ketosäure abgespalten.

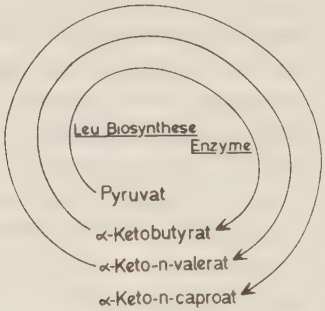


Abb. 34: Die Kettenverlängerung von α-Ketosäuren über die Biosyntheseenzyme des Leucins.

Eine physiologische Bedeutung kann bisher nur der Bildung von α-Aminobuttersäure aus Alanin und Acetyl-CoA zugeordnet werden. Diese Reaktionsfolge, die aus Pyruvat α-Ketobutyrat zu bilden vermag, stellt eine weitere physiologische Synthesemöglichkeit der im Stoffwechsel an verschiedenen Stellen benötigten α-Ketobuttersäure dar. In Analogie zu den Untersuchungen von ABRAMSKY und SHEMIN (1965) dürfte auch in Hydrogenomonas H 16 eine threonin-unabhängige Isoleucinsynthese möglich sein.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Einige Aminosäureantimetabolite wurden hinsichtlich ihrer bacteriostatischen Wirkung auf Hydrogenomonas H 16 geprüft. Ein wirksamer Antimetabolit ist DL-5',5',5'-Trifluorleucin; es verhindert in Konzentrationen ab 5 x 10^{-5}M das Wachstum einer Zellsuspension mit 10^{8} Zellen je ml.

2. Die bacteriostatische Wirkung von DL-TFL kann spezifisch durch Zusätze von L-Leucin oder α-Ketoisocapronsäure aufgehoben werden.

3. Nach Mutationsauslösung mit 1-Methyl-3-nitro-1-nitrose-guanidin konnten 27 unabhängige Resistenzmutanten isoliert werden, die eine 1000fach erhöhte Toleranz gegen DL-Trifluorleucin aufwiesen.

4. Einige der isolierten Resistenzmutanten veranlaßten den Wildtyp auf antimetabolit-haltigem Agar zum Wachstum. Diese Mutanten akkumulierten bei organotropher Anzucht mit Fructose als C-Quelle 100 ug Valin, 20 ug Leucin und Spuren Isoleucin (bzw. eines Isoleucinvorläufers) je ml Nährlösung. Durch die Verwendung von Laktat als C-Quelle konnte die Valinausscheidung auf 270 ug und die Leucinausscheidung auf 65 ug je ml gesteigert werden.

5. Molekularer Wasserstoff hat eine konservierende Wirkung auf die akkumulierten Aminosäuren. In den mit Luft begasten Kulturen werden die Aminosäuren gegen Ende der Wachstumsphase vollständig verwertet, während in wasserstoffbegasten Kulturen die Aminosäuren vollständig erhalten bleiben.

6. Hydrogenomonas verfügt über das charakteristische Enzym des herkömmlichen Biosyntheseweges der Leucinbildung, die Isopropylmalat-Synthase. Die Aktivität des Enzyms wurde fluorometrisch in zellfreien Extrakten bestimmt.

7. Die Bildung der α-IPM-Synthase in Hydrogenomonas wird durch das Endprodukt L-Leucin gesteuert. Durch zugesetztes L-Leucin

wird die Synthese in den Zellen herabgesetzt; die Aktivität der α-IPM-Synthase ist um ein Drittel gegenüber den Zellen vermindert, die ohne Leucinzusatz gewachsen sind. In einer leucin-auxotrophen Mutante, die unter Leucinbegrenzung angezogen wurde, ist die Aktivität auf das 21fache erhöht.

8. Die α-IPM-Synthase wird durch L-Leucin oder DL-Trifluorleucin bis zu 95 % bzw. 85 % gehemmt. Die Hemmung ist stark vom pH-Wert abhängig. Bei pH 8,4 konnte bei optimaler Enzymaktivität überhaupt keine Hemmung durch L-Leucin festgestellt werden, desgleichen war bei pH 6,0 keine Hemmung meßbar. Das Optimum der Hemmbarkeit des Enzyms liegt bei pH 7,2.

9. Die Hemmung der α-IPM-Synthase durch L-Leucin oder DL-Trifluorleucin wird durch andere strukturverwandte Aminosäuren aufgehoben. Als aktivitätssteigernde Aminosäuren waren wirksam: L-Valin, L-Isoleucin, DL-α-Aminobuttersäure, DL-Norvalin, DL-Norleucin und Cycloleucin. Die Hemmung der Isopropylmalat-Synthase ist vom jeweiligen Verhältnis zwischen negativem und positivem Effektor abhängig.

10. Die α-IPM-Synthase von Hydrogenomonas vermag außer α-Ketoisovaleriansäure eine Reihe weiterer Ketosäuren mit Acetyl-CoA zu kondensieren. Glyoxylsäure, Brenztraubensäure, α-Ketobuttersäure, α-Keto-n-valeriansäure und α-Keto-isocapronsäure werden umgesetzt. Als Maß des durch die α-IPM-Synthase katalysierten Reaktionsanteils an den Kondensationen diente die Hemmbarkeit des Enzyms durch L-Leucin. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist in hohem Maße von der Art der eingesetzten α-Ketosäure abhängig.

11. Die physiologische Bedeutung der in vitro gefundenen Eigenschaften der α-IPM-Synthase wird durch folgende Befunde gestützt: Zwei Gruppen von Mutanten waren infolge einer Überproduktion von Valin gegen den spezifischen Leucinantimetaboliten 5',5',5'-Trifluorleucin resistent geworden: In der einen Gruppe verursacht die konstitutive Derepression der Acetohydroxysäure-Synthase, in der anderen Gruppe die Un-

empfindlichkeit der Acetohydroxysäure-Synthase gegen L-Valin, die Überproduktion von Valin. Der Valinüberschuß verhindert in der Zelle die Hemmung der Isopropylmalat-Synthase durch den Antimetaboliten DL-Trifluorleucin.

Daneben sind unter den gegen Trifluorleucin unempfindlichen Mutanten solche mit leucinunempfindlicher und solche mit konstitutiv dereprimierter Isopropylmalat-Synthase gefunden worden.

12. Die Unspezifität der Isopropylmalat-Synthase und die unspezifische Katalyse der weiteren Leucinbiosynthese-Enzyme wird durch die Ausscheidung von Aminosäuren durch eine valin- und isoleucin-auxotrophe Mutante von Hydrogenomonas wahrscheinlich gemacht. Aus dem Fermentationsmedium dieser Mutante lassen sich nach Zugabe von aliphatischen α-Aminosäuren und ^{14}C-1-Essigsäure, die um ein C-Atom verlängerten homologen ^{14}C-1-markierten α-Aminosäuren isolieren. Es konnten neben Valin, das in ^{14}C-1-Leucin übergeführt wurde, aus Alanin ^{14}C-1-α-Aminobuttersäure, aus α-Aminobuttersäure ^{14}C-1-Norvalin und aus Norvalin ^{14}C-1-Norleucin erhalten werden.

METHODEN

Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden Hydrogenomonas H 16 (WILDE 1961) und davon abgeleitete Mutanten verwendet.

Die erwähnten Mutanten wurden durch Mutation und Selektion erhalten. Eine Charakteristik der Mutanten wird in Tab. 17 wiedergegeben.

Tab. 17: Charakteristik der verwendeten Mutanten.

Bezeichnung	Mutagenes Agenz	Selektionsmittel	Defekt
leu$^-$ 05	Diäthylsulfat	Colistin	(?)
und alle weiteren Leucin auxotrophen Mutanten			(?)
vi$^-$ 43	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin	Colistin	AHS-Synthase$^-$
vi$^-$ 34	"	"	"
vi$^-$ 9	"	"	"
TFL^r S 1 bis S 20	"	Trifluorleucin	verschieden (s. Ergebnis.)
TFL R 1 bis R 7	"	"	"
SR Ia*	spontan	Prototrophie	Valin-Hemmbarkeit der AHS-Synthase
SR Ic*	"	"	
SR IIa*	"	"	

* von H 16 vi$^-$ 34 abgeleitete Mutanten.

Zu Vergleichsuntersuchungen wurden Escherichia coli K 12, Pseudomonas aeruginosa und Micrococcus denitrificans (VOGT 1964) der Institutssammlung entnommen.

Anzucht und Nährlösungen

Die Bakterien wurden in der von SCHLEGEL et al. (1961) angegebenen Mineralllösung angezogen. Eine Spurenelementlösung wurde nach PFENNIG und LIPPERT (1966) angesetzt und in der entsprechenden Konzentration zu der Mineralllösung zugegeben. Für organotrophes Wachstum wurde die getrennt sterilisierte C-Quelle zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugesetzt. Zur Verfestigung der Nährböden wurden 1,5 % Agar zugefügt. Angereicherte Minimalnährböden für die auxotrophen Mutanten enthielten zusätzlich 0,005 % Casamino acids, Vollnährböden den jeweils benötigten Wuchsstoff in 2 mM Konzentration.

Antimetabolit-Nährböden enthielten zusätzlich den jeweiligen Antimetaboliten in 10^{-3}M Konzentration.

Messung des Bakterienwachstums

Trübungsmessungen von Bakteriensuspensionen wurden im Beckman-Spektralphotometer DU durchgeführt. Die Wellenlänge des Lichtes betrug 600 nm, der Lichtweg 10 mm und die Spaltbreite 0,5 mm. Bei Extinktionen über 0,4 wurde die Suspension mit Wasser verdünnt.

Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen geeignet verdünnter Bakteriensuspensionen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Lebendzellzahl wurde durch Ausspateln von Reihenverdünnungen von Kultursuspensionen auf Fructose-Mineral-Agar bestimmt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der von SCHMIDT et al. (1963) modifizierten Biuretmethode. 4 ml Zellsuspension oder 0,1 ml Rohextrakt, der auf 4 ml verdünnt wurde, wurden nach Zugabe von 0,4 ml 16 %iger NaOH vermischt, 10 min im siedenden

Wasserbad erhitzt und dann auf Zimmertemperatur abgekühlt. Es wurden 1,6 ml Biuret-Reagenz (5 g Na-K-tatrat, 1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O, 2,5 g KJ, 4 g NaOH, 400 ml H_2O dest.) zugesetzt, gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min bei 5000 U/min) wurde die klare Lösung gegen einen Leerwert gemessen (Beckman-Spektralphotometer DU, 546 nm, 10 mm Lichtweg, 0,5 mm Spaltbreite). Der Proteingehalt der Suspension wurde durch einen Vergleichswert eines Ansatzes mit bekanntem Proteingehalt aus lyophilisiertem Rinderserumalbumin errechnet.

Das Trockengewicht von Bakteriensuspensionen wurde auf Membranfiltern bestimmt (Gewichtskonstante Membranfilter MF 14, Sartorius GmbH, Göttingen). Die Filter wurden im Aluminiumbecher 36 Std. auf 80°C erhitzt, im Exsiccator getrocknet und ausgewogen. 40-10 ml Bakteriensuspension wurde auf den Filtern abgesaugt, zweimal mit 2 ml H_2O gewaschen und 48 Std. im Trockenschrank bei 90°C getrocknet. Nach Abkühlung im Exsiccator wurde erneut ausgewogen. Aus der Differenz der Wägungen wurde das Trockengewicht errechnet.

Die Anzucht von auxotrophen Mutanten unterWuchsstoffbegrenzung

Die Rührkultur von SCHLEGEL et al. (1961) wurde apparativ erweitert, um während des Bakterienwachstums den gleichmäßigen Zufluß einer Lösung zu erreichen. Die Apparatur ist in der Abb. 35 wiedergegeben.

Ein konstanter Luftdruck von 600 mm Wassersäule (Reduzierventil, Drägerwerk/Lübeck) drückte Wuchsstofflösung aus einem graduierten Standzylinder in ein Kulturgefäß (6l Zweihalsschliffkolben mit ebenem Boden). Der Zufluß der Lösung wurde durch ein Magnetventil (Radiometer/Kopenhagen) unterbrochen. Über einen Timer (SCHUSTER 1967) erhielt das Ventil einen Impuls, der den Durchfluß freigab. Die Impulsfolge war von 0,3-30 sec. in Stufen, die Durchflußmenge durch eine Quetschschraube stufenlos verstellbar. Bei geeigneter Einstellung konnten 40-400 ml in 24 Std. ($\pm$ 10 ml) zugetropft werden. Normalerweise wurden in 24 Std. 200 ml Wuchsstofflösung zugegeben.

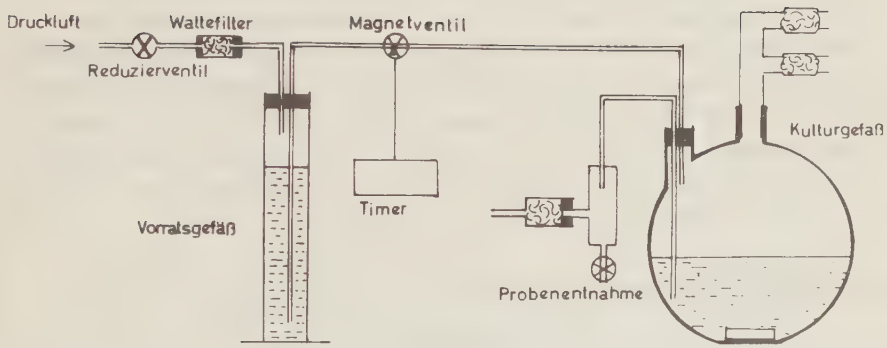


Abb. 35: Apparatur zur Anzucht von auxotrophen Mutanten unter Wuchsstoffbegrenzung.

Manometrische Messungen

Zellen einer logarithmisch wachsenden Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation geerntet, zweimal in KPO_4-Puffer (pH 7,0; 0,067 M) gewaschen und klumpenfrei in demselben Puffer auf die gewünschte Konzentration suspendiert. Zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme wurden 2 ml Zellsuspension der Extinktion $E_{600\ nm}$ = 1,0 in den Hauptraum von Warburggefäßen (Fa. Braun/Melsungen) einpipettiert. Der Zentralzylinder enthielt 0,2 ml 20 %ige KOH, der Seitenarm 10 µmole des jeweiligen Substrats in 0,3 ml Wasser. Nach Temperaturausgleich bei 30°C wurde das Substrat in den Hauptraum gekippt und der Sauerstoffverbrauch bestimmt.

Aminosäurebestimmung nach ROSEN (1957)

Zu einer Probe von 1 ml, die 0,02-0,4 µmole Aminosäure enthielt, wurde 0,5 ml Acetat-Puffer gegeben (27 g Na-acetat x 3 H_2O, 20 ml H_2O und 5 ml Eisessig wurden ad 75 ml mit Wasser aufgefüllt,

der pH-Wert betrug 5,3-5,4. Dazu wurden 15 ml 0,01 M NaCN Lösung gegeben). Zu der Aminosäureprobe in Acetatpuffer wurden 0,5 ml Ninhydrinreagenz (3 %ige Ninhydrinlösung in Methylcellosolve) zugegeben. Es wurde 15 min im siedenden Wasserbad erhitzt, dann sofort ohne Abkühlung 5 ml Isopropanol (50 T)-Wasser (50 T) zugegeben und kräftig geschüttelt. Die Extinktionsmessung der Lösung erfolgte im Beckman-Spektralphotometer DU (570 nm, 10 mm Lichtweg, 0,5 mm Spaltbreite). Als Bezugspunkt diente ein Leerwert ohne Aminosäure. Unter diesen Bedingungen ergab 1 µmol Leucin (bzw. Valin) eine Extinktion von 0,4.

Aminosäurebestimmung nach FISCHER und DÖRFEL (1953)

1-20 µg Aminosäure wurden auf Macherey und Nagel Papier MN 2261 aufgetragen. Es wurde absteigend in Faserrichtung chromatographiert. Als Laufmittelgemisch wurde n-Butanol-Eisessig-H_2O (80 : 20 : 20) benutzt. Das entwickelte Chromatogramm wurde nach Lufttrocknung gleichmäßig mit Ninhydrinreagenz (0,5g Ninhydrin in 93 ml wassergesättigtem n-Butanol und 7 ml Eisessig) getränkt. Zur vollen Farbentwicklung wurde das Chromatogramm 30 min auf 70°C im Trockenschrank erhitzt. Die Farbflecke wurden in gleichgroßen Stücken ausgeschnitten, in Reagenzgläser gebracht und mit 0,5 ml Kupferreagenz versetzt (2 ml gesättigte Cu-II-nitrat Lösung, 0,4 ml 10 %ige HNO_3 und 100 ml 96 %iges Äthanol). Nach Zugabe von 2,75 ml Methanol wurde mit Parafilm verschlossen und während 20 min mehrmals mit dem Mixomat (Fa. Boskamp/Hersel) kräftig geschüttelt. DieExtinktion der Lösung wurde im Beckman Spektralphotometer DU (509 nm, 10 mm Lichtweg, 0,5 mm Spaltbreite) gegen einen Papierleerwert ohne Aminosäure gemessen. Das Verhältnis von aufgetragener Menge Aminosäure (Valin) zur gemessenen Extinktion gibt die Eichkurve in Abb. 36 wieder.

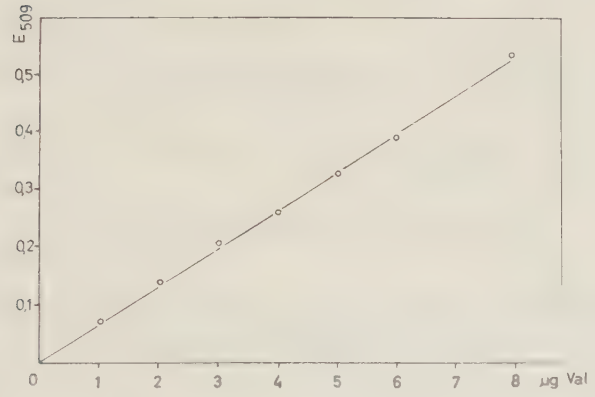


Abb. 36: Eichkurve zur Valinbestimmung nach FISCHER und DÖRFEL (1953).

Die Acetoinbestimmung (bzw. α-Acetomilchsäure) nach WESTERFELD (1945)

Ein 2 ml Ansatz wurde mit 0,6 ml 3 N H_2SO_4 versetzt und im Wasserbad 20 min auf 65°C erhitzt. Unter diesen Bedingungen decarboxylierte die Acetomilchsäure und konnte bei der Acetoinbestimmung miterfaßt werden. Nach Zentrifugation (5 min bei 3000 U/min) wurden 0,5 ml des klaren Überstandes zu 2 ml H_2O pipettiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Kreatinlösung (0,5 %ig) und 0,5 ml Naphthollösung (0,5 %ig in 2,5 N NaOH) wurde umgeschüttelt und 60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Extinktion des Ansatzes wurde im Beckman Spektralphotometer DU (546 nm, 10 mm Lichtweg, 0,5 mm Spaltbreite) gegen einen Ansatz ohne Acetoinzugabe (stattdessen 0,5 ml H_2O) gemessen.

Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität von ^{14}C-Verbindungen in wässriger Lösung wurde in der von Bray (1960) angegebenen Scintillationsflüssigkeit mit dem Scintillationszähler (Tricarb Modell 3375, Fa. Packard/Fir.)

bestimmt. DieScintillationsflüssigkeit enthielt:

60 g Naphthalin
4 g Diphenyloxazol
0,2 g 1,4-Di-2-(4-methyl-5-phenoxazolyl)-benzol
100 ml Methanol
20 ml Äthylenglykol
Dioxan ad 1000 ml

Zu 0,005 ml - 0,02 ml wässriger Lösung wurden 10 ml Scintillationslösung gegeben.

Zur Auswertung von Papierchromatogrammen wurden gleichgroße Papiersegmente aus dem Chromatogramm ausgeschnitten und in 10 ml Scintillationsflüssigkeit ausgezählt. Die Ausbeuteverminderung durch das Papier betrug 38 %.

Membranfilter wurden in einer Toluolscintillationsflüssigkeit ausgezählt, die folgende Zusammensetzung hatte:

5 g Diphenyloxazol
0,3 g 1,4-Di-2-(4-methyl-5-phenoxazolyl)-benzol
1000 ml Toluol

Zur Lokalisation von Radioaktivität auf Papierchromatogrammen wurde außerdem der Papierradiochromatograph FH 452 mit angeschlossenem Potentiometerschreiber FHK/542 (Fa. Frieseke und Hoepfner/Erlangen) benutzt.

Papierchromatographie

Aminosäuren wurden zur Reinigung und zur quantitativen Bestimmung eindimensional auf Papier chromatographiert. Dabei kamen folgende Papiersorten zur Anwendung: MN 214 und MN 2261 (Fa. Macherey & Nagel/Düren) und SS 2043a/Säure gewaschen (Fa. Schleicher & Schüll/Dassel).

Als Laufmittelgemische wurden verwendet:

n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 Teile + 1 Teil + 1 Teil)
n-Butanol, wassergesättigt

n-Propanol-Ammoniak-Wasser (6 Teile + 3 Teile + 1 Teil)
Äthylacetat-Pyridin-Wasser (2 Teile + 1 Teil + 2 Teile)
Phenol wassergesättigt
sek. Butanol-Ameisensäure-Wasser (6 Teile + 1 Teil + 2 Teile)
Äther-Eisessig-Wasser (13 Teile + 3 Teile + 1 Teil)

Falls nicht anders angegeben, wurde absteigend in Faserrichtung chromatographiert.

Dünnschichtchromatographie

Für qualitative Trennungen wurde die Dünnschichtchromatographie nach STAHL (1962) eingesetzt. Glasplatten wurden mit einer 0,25 mm starken Schicht aus Cellulose-Gips (MN 300 G, Fa. Macherey & Nagel/Düren) überzogen. Nach Lufttrocknung wurden die Platten ohne weitere Vorbehandlung zur Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die Lokalisation von Aminosäuren erfolgte mit dem Ninhydrinreagenz (s. quantitative Aminosäurebestimmung).

Ionenaustauschchromatographie

Um aus Lösungen Säuren von neutralen Produkten abzutrennen, wurden die Lösungen durch eine Dowex 1 x 8 (200-400 mesh)/Formiat Säule gegeben. Neutrale Substanzen wurden mit Aqua dest. durch die Säule gewaschen, Säuren wurden mit 1 N HCl aus der Säule eluiert. Das Dowex 1 x 8/Formiat wurde aus der handelsüblichen Chloridform durch Waschen mit 2 N NaOH, anschließendes Neutralwaschen und Beladen mit 2 N Ameisensäure hergestellt. Der neutral gewaschene Austauscher wurde in Säulen gefüllt und für die Trennungen verwendet.

Decarboxylierung von Aminosäuren

Aminosäuren wurden nach der Vorschrift von STRASSMAN et al. (1955) decarboxyliert. In einem Dreihalskolben wurden 1,5 mmol Aminosäure in 35 ml Wasser aufgelöst. Dazu wurde 0,15 ml konz. H_3PO_4 gegeben. Durch einen Ansatzstutzen wurde ein CO_2-freier N_2-Strom in das Gefäß eingeleitet. Durch einen zweiten Ansatz

passierte der N_2-Strom einen Rückflußkühler, danach eine Trocknungseinheit mit Mg-perchlorat und dann eine CO_2-Absorptionsfalle mit 10 ml 2 N KOH. Durch die dritte Schlifföffnung des Gefäßes wurde, nachdem der Ansatz in Eis gekühlt worden war, 800 mg Ninhydrin in fester Form zugesetzt. Dann wurde das Reaktionsgefäß erwärmt und 1 Std. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dabei wurde ein schwacher Stickstoffstrom durch die Apparatur geleitet. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz mit 50 ml Wasser verdünnt und der gebildete Aldehyd in eine eisgekühlte Vorlage abdestilliert. Die Radioaktivität wurde im Rückstand, im abdestillierten Aldehyd und im CO_2, das in der KOH absorbiert worden war, bestimmt.

Die Messung der Radioaktivität des Kohlendioxyds erfolgte nach Übertreiben in die organische Base p-(Diisobutyl-cresoxyäthoxyäthyl)-dimethylbenzylammoniumhydroxyd (=Hyamin). Dazu wurden in ein 15-ml-Warburggefäß 0,5 ml der KOH, die das Kohlendioxyd enthielt, vorgelegt. In den Seitenansatz wurden 0,3 ml 12 N H_2SO_4 und in den Zentralzylinder 0,3 ml 1 N Hyaminlösung in Methanol pipettiert. Nachdem das Gefäß mit Schliffstopfen fest verschlossen worden war, wurde die Säure in den Hauptraum gekippt und zur Absorption des freigesetzten CO_2 wurde 3-4 Std. geschüttelt. Dann wurde die Hyamin-Lösung in ein Zählgläschen überführt und der Zentralzylinder mehrere Male mit Scintillationsflüssigkeit gespült.

Mutationsauslösung

Die Auslösung von Mutationen erfolgte entweder durch 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (MANDELL und GREENBERG 1960) oder durch Diäthylsulfat (GOLDBERG et al. 1965).

Die Mutation mit NMG wurde nach der von REH (1967) angegebenen Methode durchgeführt. Zu einer wachsenden Zellsuspension von Hydrogenomonas mit 2 x 10^8 Zellen pro ml wurde NMG-Lösung (1 mg in 10 ml Aqua dest.) zu einer Endkonzentration von 50 ug/ml gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 28°C wurde die Flüssigkeit

durch Membranfilter (MF 14, Sartorius GmbH, Göttingen) abgesaugt, es wurde zweimal mit steriler Nährlösung nachgewaschen; die Bakterien wurden in Nährlösung resuspendiert. Es wurde auf verschiedene Ansätze mit Komplettnährmedium aufgeteilt und bis zum deutlich sichtbaren Anwachsen der überlebenden Bakterien bei 28°C inkubiert.

Die Mutation durch Diäthylsulfat erfolgte in der Weise, daß 0,1 ml Diäthylsulfat zu einer Bakteriensuspension von 10^8 Zellen pro ml in insgesamt 20 ml zupipettiert wurde. Unter Schütteln wurde 60 min bei 28°C inkubiert. Dann wurde wie in dem Ansatz mit NMG abgesaugt, gewaschen und in Komplettmedium aufgenommen. Unter diesen Bedingungen wurden in 60 min 99,9 % aller Bakterien abgetötet.

Anreicherung auxotropher Mutanten

Für Hydrogenomonas H 16 war Colistin ein wirksames Abtötungsmittel für heterotroph wachsende Zellen (SCHLEGEL et al. 1965). Zur Anreicherung auxotropher Mutanten wurde das von REH (1967) angegebene Verfahren angewendet. Eine wachsende mutagenisierte Bakteriensuspension wurde zweimal in stickstoff-freiem Mineralmedium gewaschen und in demselben Medium auf 5 x 10^7 Zellen/ml verdünnt. Es wurde 5 Std. bei 28°C inkubiert und dann NH_4Cl zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugefügt. Nach weiteren 5 Std. wurde Colistinsulfat bis zu einer Endkonzentration von 50 ug/ml zugesetzt und 10 Std. bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 1:10 verdünnt und 0,1 ml der Bakteriensuspension sofort auf Komplettmedium ausplattiert.

Isolierung auxotropher Mutanten

Nach dreitägiger Inkubation auf Komplettmedium wurden die Kolonien unter Verwendung der replica-plating-Technik (LEDERBERG und LEDERBERG 1952) auf Minimalmedium abgestempelt.

Kolonien, die auf dem Minimalmedium nicht mehr heranwuchsen, wurden isoliert, durch einen Verdünnungsausstrich auf Komplett-

medium gereinigt und auf ihre Wuchstoffansprüche geprüft.

Isolierung von antimetabolit-resistenten Zellen

0,1 ml mutagenisierte Bakteriensuspension wurde auf Antimetabolit enthaltendem Agar ausplattiert. Nach einer Woche wurden Resistenzkolonien isoliert und durch Verdünnungsausstrich auf Nutrient-broth-Medium gereinigt. Die Stämme wurden auf die Stabilität der Resistenzeigenschaften geprüft und dann auf Fructose-Mineral-Agarschrägröhrchen abgeimpft.

Herstellung zellfreier Extrakte

Gepackte Zellen, die zweimal mit KPO_4-Puffer (0,05 M, pH 7,2) gewaschen worden waren, wurden in derselben Gewichtsmenge des Puffers suspendiert und bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren. Zur Herstellung zellfreier Extrakte wurde die Zellsuspension aufgetaut, jeweils 3-5 ml wurden mit Ultraschall aufgeschlossen (Fa. Schoeller/Ffm.). Es wurde in 30 sec. Intervallen 5 min bei einer Leistung von 300 W mit 20 kHz beschallt. Dabei wurde durch Kühlung mit dem Ultrakryomaten TK 30 D (Meßgerätewerk Lauda) die Temperatur des Ansatzes zwischen 0 und 10°C gehalten. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (100 000 g, 30 min) abgetrennt. Der klare Rohextrakt wurde unmittelbar darauf für die Aktivitätstests eingesetzt.

Bestimmung der α-Acetohydroxysäure-Synthaseaktivität

a) Test mit ganzen Zellen (HALPERN und UMBARGER 1959). Zellen aus einer wachsenden Kultur wurden abzentrifugiert und zweimal mit 10 ml KPO_4-Puffer (0,1 M, pH 7,4) gewaschen und in demselben Puffer auf die optische Dichte $E_{600\ nm} = 1,0$ suspendiert. Zu 2 ml Zellsuspension wurden 0,02 ml Toluol gegeben und unter Umschütteln 30 min im Wasserbad bei 30°C inkubiert.

Dann wurde folgender Ansatz gemacht:
0,5 ml Zellen
0,5 ml Mix mit 50 µmol Na-Pyruvat, 1 µmol $MgCl_2$ und 0,1 mg TPP.

Nach 20 min Inkubation bei 30°C wurde durch Zugabe von 0,3 ml 3 N H_2SO_4 abgestoppt. Das entstandene Acetolaktat wurde wie angegeben (Acetoinbestimmung) colorimetrisch bestimmt.

b) Test im Rohextrakt (UMBARGER und BROWN 1958)
In ein Zentrifugenglas wurden pipettiert:

0,5 ml Na-Pyruvat 100 µmole
1,0 ml KPO_4-Puffer (0,1 M; pH 7,4) 100 µmole
0,01 ml $MgCl_2$ (0,1 M) 1 µmol
0,2 ml Thiaminpyrophosphat (1 mg/ml) 0,2 mg
0,27 ml Wasser
0,02 ml Rohextrakt oder mit Phosphatpuffer verdünnter Rohextrakt

Nach 20 min Inkubation bei 30°C wurde durch die Zugabe von 0,6 ml 3 N H_2SO_4 abgestoppt. Es wurde 20 min auf 65°C erwärmt, zentrifugiert und das Acetoin (s. Acetoinbestimmung) colorimetrisch bestimmt.

Bestimmung der α-Isopropylmalat-Synthase-Aktivität

Der Test wurde auf den Angaben von STRASSMANN und CECI (1963) aufgebaut.

Es wurde folgender Ansatz gemacht:

1 ml	KPO_4-Puffer (0,2 M; pH 7,4)	200 µmole
0,2 ml	K-Ketoisovalerat (0,1 M)	20 µmole
0,2 ml	Acetylphosphat-Li_2 (0,1 M)	20 µmole
0,2 ml	Coenzym A (1 mg/ml)	0,2 mg
0,01 ml	krist.Phosphotransacetylase (1 mg Prot/ml)	0,1 mg
0,35 ml	H_2O	
0,04 ml	Rohextrakt	

Es wurde durch die Zugabe des Rohextraktes gestartet und 30 min bei 30°C inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml 3 N H_2SO_4 wurde der Ansatz abgestoppt, in Eis gekühlt und mit 5 ml Äther versetzt. Die mit Polyäthylenstopfen verschlossenen Röhrchen wurden kräftig mechanisch geschüttelt ("Mixomat", Fa. Boskamp/

Hersel) und danach 5 min bei 3 000 U/min zentrifugiert. Von der organischen Phase wurden genau 2,5 ml abgehebert und in ein weiteres Reagenzglas übertragen. Der Äther wurde im Luftstrom bei 40°C abgetrieben und der Rückstand sorgfältig mit 0,4 ml konz. H_2SO_4 vermischt. Die Röhrchen wurden mit Polyäthylenkappen verschlossen und 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurden 0,5 ml Resorcinlösung unter Umschütteln (1 g frisch sublimiertes Resorcin in 10 ml H_2O) und 1 ml konz. HCl zugegeben. Die Ansätze wurden 15-20 Std. an einem dunklen Ort aufbewahrt. Dann wurde zu jedem Ansatz tropfenweise unter Umschütteln 7,0 ml 30 %ige Na_2CO_3-Lösung und 3,5 ml Borat-Puffer (7,32 g Borsäure in 1 000 ml 0,1 N Na_2CO_3-Lösung) zugefügt. Nach dem Vermischen wurde die Fluorescenz der Proben im Eppendorf-Photometer (Netheler & Hinz/Hamburg) mit einem Fluorescenzzusatzgerät bestimmt. Das anregende Licht wurde durch den Primärfilter Hg 366 gefiltert. Die Probe befand sich in einer 1 cm Quarzküvette, um die Eigenfluorescenz des Ansatzes niedrig zu halten. Das Fluorescenzlicht wurde durch einen Sekundärfilter (450-3000 nm) gefiltert. Als Bezugspunkt für die Messung diente ein mitgelieferter Glasstandard (Nr. 4617), auf dessen Fluorescenz der volle Ausschlag des Photometers mit 100 Einheiten eingestellt wurde. Höhere Meßwerte wurden durch die Benutzung des Stufenschalters bestimmt. Eine Verdünnung der Ansätze war nicht möglich, da keine lineare Beziehung zwischen Verdünnungsgrad des Ansatzes und gemessener Fluorescenz bestand.

Unter Testbedingungen wurde mit synthetischer DL-α-Isopropyläpfelsäure eine Eichkurve aufgenommen. Jeder Ansatz enthielt in 2 ml H_2O:

0 bis 200 µg DL-α-Isopropyläpfelsäure
20 µmole K-α-Ketoisovaleriansäure
20 µmole K-Acetat
200 µmole KPO_4 pH 7,4
1000 µg Serumalbumin

Entsprechend dem oben beschriebenen Verfahren wurde die Fluorescenz der Ansätze bestimmt. Die lineare Beziehung zwischen der

eingewogenen Menge synthetischer α-Isopropyläpfelsäure und gemessener Fluorescenz gibt die Abb. 37 wieder.

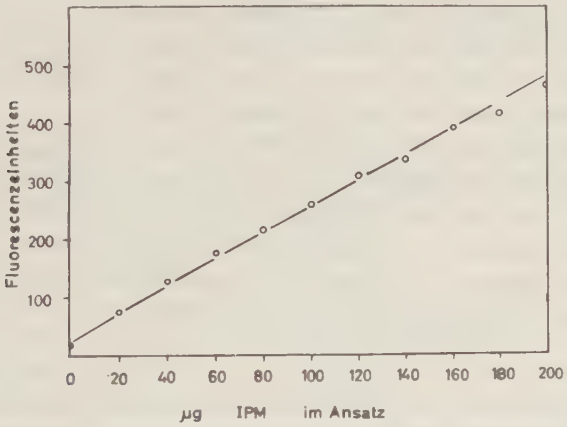


Abb. 37: Eichkurve zur fluorometrischen Bestimmung der IPM.

Bestimmung der Leucin (Valin, Isoleucin und Trifluorleucin)-α-Ketoglutarsäure-Transaminaseaktivität nach TAYLOR und JENKINS (1966)

Der Ansatz enthielt in 3 ml:

20 µmole α-Ketoglutarsäure
20 µmole L-Leucin (bzw. L-Ile, L-Val, DL-TFL)
0,1 mg Pyridoxal-Phosphat
100 µmol Natriumpyrophosphat

Der pH-Wert des Ansatzes betrug 8,5. Durch die Zugabe von 0,02 ml Rohextrakt mit 0,6 mg Protein wurde die Reaktion gestartet. Nach 10 min wurde durch die Zugabe von 1,0 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz (600 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden mit 34 ml konz. HCl im Mörser verrührt, auf 200 ml mit H_2O aufgefüllt und filtriert. Das Reagenz war bei 4°C in einer dunklen Flasche 14 Tage haltbar) abgestoppt. Zur Hydrazonbildung wurde 10 min

lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde das gebildete Hydrazon mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert.

a) Zur Extraktion des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der α-Ketoisocapronsäure wurden 5,0 ml Cyclohexan zugesetzt. Das Röhrchen wurde mit einer Polyäthylenkappe verschlossen und kräftig geschüttelt. Dann wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. 4,1 ml der oberen Phase wurden abgehebert und in ein frisches Reagenzglas überführt. Es wurde 1,5 ml 10 %ige Na_2CO_3-Lösung zugesetzt, kräftig geschüttelt und nach Zentrifugation 1,0 ml der wässrigen Phase in ein weiteres Reagenzglas überführt. Nach Zusatz von 2,0 ml 1 N NaOH wurde umgeschüttelt und die Extinktion des Ansatzes im Beckman Spektralphotometer DU (440 nm, 10 mm Lichtweg, 0,5 mm Spaltbreite) gemessen.

b) Die Hydrazone der Ketosäuren des Valins, Isoleucins und Trifluorleucins wurden in folgender Weise extrahiert: Die Röhrchen wurden nach Zugabe von 5,0 ml Äthylacetat mit Polyäthylenkappen verschlossen, kräftig geschüttelt und zentrifugiert. 4,5 ml der organischen Phase wurde in ein zweites Reagenzglas übertragen. Dazu wurden 2,0 ml Carbonat-Sulfatlösung gegeben (5,3 g Na_2CO_3, 0,84 g $NaHCO_3$ und 200 mg Na_2SO_4 in 1000 ml H_2O) und gut durchgeschüttelt. Nach Zentrifugation wurden 4,0 ml der organischen Phase in ein drittes Reagenzglas übertragen. Es wurden 5 ml Petroläther und 1,5 ml Carbonatlösung (0,1 N Na_2CO_3-0,01 N $NaHCO_3$) zugegeben, kräftig geschüttelt und zentrifugiert. 1 ml der wässrigen Phase wurde in ein viertes Reagenzglas übertragen, mit 2,0 ml 1 N NaOH versetzt und nach Umschütteln wurde in der oben beschriebenen Weise die Extinktion des Ansatzes bestimmt.

Unter diesen Bedingungen war die gemessene Extinktion der Inkubationszeit direkt proportional. Aus einer Eichkurve wurde bestimmt, daß 1 µmol gebildetes α-Ketoisocaproat im ursprünglichen Testansatz eine Extinktion von 1,35 ergab.

1 µmol α-Ketoisovalerat ergab unter diesen Testbedingungen eine Extinktion von 1,18. Der Wert für die Ketosäuren des Isoleucins und Trifluorleucins wurde nicht bestimmt, sondern angenähert mit dem für Ketoisovaleriansäure bestimmten Wert berechnet.

Die Chemikalien waren von höchstem handelsüblichen Reinheitsgrad. Die verwendeten speziellen Chemikalien und Biochemikalien hatten folgende Herkunft:

ATP: Fa. C.F. Boehringer & Söhne, Mannheim;
Thiaminpyrophosphat: Fa. Merck AG, Darmstadt;
Pyridoxal-5-phosphat: Fa. Fluka, Buchs;
Coenzym A: The British Drug Houses Ltd.;
Phosphotransacetylase und
Acetokinase: Fa. Boehringer & Söhne, Mannheim;
Colistinsulfat: Fa. Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg;
^{14}C-U-Leucin und
^{14}C-1-Acetat-Na: New England Nuclear Corp., Boston;
Acetylphosphat-Li_2: Sigma Chemical Comp., St. Louis;

Dankenswerter Weise wurden zur Verfügung gestellt:

DL-α-Isopropyläpfelsäure von Herrn Prof. Dr. W.R. Martin, Chicago;
L-S-(ß-Aminoäthyl)cystein von Herrn Dr. P. Hermann, Halle;
eine erste Probe DL-5',5',5'-Trifluorleucin von Herrn Dr. J.M.Calvo, New York;

weiteres DL-TFL wurde von der Pierce Chemical Comp. (Rockford) nach der Vorschrift von RENNERT und ANKER (1963) synthetisiert.

LITERATUR

ABRAMSKY, T. SHEMIN, D.	1965	The formation of isoleucine from ß-methylaspartic acid in Escherichia coli W. J.Biol.Chem. 240, 2971-2975.
ADELBERG, E.A.	1958	Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. J.Bacteriol. 76, 326.
ALLISON, M.J. BRYANT, M.P. DOETSCH, R.N.	1962	Studies on the metabolic function of branched chain volatile fatty acids, growth factors for Ruminococci. I. Incorporation of isovalerate into leucine. J.Bacteriol. 83, 523-532.
ALLISON, M.J. BUCKLIN, J.A. ROBINSON, J.M.	1966	Importance of the isovalerate carboxylation pathway of leucine biosynthesis in the rumen. Appl.Microbiol. 14, 807-814.
ANTON, D.N.	1968	Histidine regulatory mutants in Salmonella typhimurium. J.Mol.Biol. 33, 533-546.
AMES, B.N. HARTMANN, P.E.	1963	The histidine operon. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 28, 349-356.
BANDIERA, M. MORPURGO, G. RICCI, R.	1967	Tryptophan production by mutant strains of Escherichia coli K 12. Experienta 23, 724-725.
BLACKKOLB, F.	1968	Zur Regulation des Entner-Doudoroff-Abbauweges in Hydrogenomonas durch molekularen Wasserstoff. Diss. Göttingen.
BRAY, G.A.	1960	A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Anal.Biochem. 1, 279 -285.
BROCKWAY, L.O.	1937	The structures of the fluorochlormethanes and the effect of bond type on chemical reactivity. J.Phys.Chem. 41, 185-195.

BROWN, G.M.	1962	The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides. J.Biol.Chem. 237, 536-540.
BROWN, R.R.	1967	Aminoaciduria resulting from cycloleucine administration in man. Science 157, 432-434.
BURNS, R.O. UMBARGER, H.E. GROSS, S.R.	1963	The biosynthesis of leucine. III. The conversion of α-hydroxy-ß-carboxyisocaproate to α-ketoisocaproate. Biochemistry 2, 1053-1058.
BURNS, R.O. CALVO, J.M. MARGOLIN, P. UMBARGER, H.E.	1966	The expression of the leucine operon. J.Bacteriol. 91, 1570-1576.
CALVO, J.M. KALYANPUR, M.G. STEVENS, C.M.	1962	2-Isopropylmalate and 3-isopropylmalate as intermediates in leucine biosynthesis. Biochemistry 1, 1157-1161.
CALVO, J.M. UMBARGER, H.E.	1963	Feedback control of leucine biosynthesis in Salmonella typhimurium. Bacteriol. Proc., S. 126.
CALVO, J.M. UMBARGER, H.E.	1964	Mutants of Salmonella typhimurium constitutive for leucine biosynthetic enzymes. Federation Proc. 23, 377.
CALVO, R.A. CALVO, J.M.	1967	Lack of end-product inhibition and repression of leucine synthesis in a strain of Salmonella typhimurium. Science 156, 1107-1109.
CHANGEUX, J.P.	1963	Allosteric interactions on biosynthetic L-threonine deaminase from Escherichia coli K-12. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 28, 497-504.
CASIDA, L.E.	1956	Preperation of diaminopimelic acid and lysine. U.S. Pat. 2, 771, 396.
CENNAMO, C. BOLL, M. HOLZER, H.	1964	Über die Threonindehydratase aus Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Z. 340, 125-145.

COHEN, G.N. MUNIER, R.	1959	Effets des analogues structuraux d' aminoacides sur la croissance, la synthèse des proteinés et la synthèse d'enzymes chez Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 31, 347-356.
DAVIS, B.D. DULBECCO, R. EISEN, H.N. GINSBERG, H.S. WOOD, W.B.	1967	Microbiology. Hoeber Medical Division Harper & Row, New York N.Y.
DULANEY	1966	Microbiol production of amino acids: Methionine, tryptophan, homoserine, ornithine, citrulline, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, and aspartic acid. Developments in Industrial Microbiology Vol. 7, p. 47-58.
DITTMER, K.	1950	The structural basis of some amino acid antagonists and their microbiological properties. Ann. N.Y. Acad.Sci. 52, 1274-1302.
DUNN, F.W. RAVEL, J.M. SHIVE, W.	1956	Inhibition studies with peptides of thienylalanine and phenylalanine. J. Biol. Chem. 219, 809-821.
EHRLICH, F.	1907	Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweißaufbau der Hefe. Chem. Ber. 40, 1207-1047.
ELLMAN, C.L.	1959	Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.
FANGMAN, W.L. NEIDHARDT, F.C.	1964	Demonstration of an altered aminoacyl ribonucleic acid synthetase in a mutant of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 239, 1839-1843.
FISCHER, F.G. DÖRFEL, H.	1953	Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweißhydrolysaten. Biochem. Z. 324, 544-566.
FREUNDLICH, M. UMBARGER, H.E.	1963	The effects of analogues of threonine and of isoleucine on the properties of threonine deaminase. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 28, 505-511.

FREUNDLICH, M. BURNS, R.O. UMBARGER, H.E.	1962	Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis. I. Multi-valent repression. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1804-1808.
FOWDEN, L. LEWIS, D. TRISTAM, H.	1967	Toxic amino acids: Their action as antimetabolites. Advanc.Enzymol. 29, 89-163.
GADEN, E.L.jr.	1955	Fermentation kinetics and productivity. Chemistry and Industry (Rev.), 154.
GADEN, E.L.	1959	Fermentation process kinetics. J. Biochem. Microbiol. Techn. Engng. Vol. 1, No. 4, 413.
GOLDBERG, I.D. KENG, J.G. THORNE, C.B.	1965	Isolation of auxotrophs of Bacillus cereus. J. Bacteriol. 89, 1441.
GOTTSCHALK, G.	1965	Die Verwertung organischer Substrate durch Hydrogenomonas in Gegenwart von molekularem Wasserstoff. Biochem. Z. 341, 260-270.
GRAY, C.T. KORNBERG, H.L.	1960	Enzymic formation of citramalate from acetyl-coenzyme A and pyruvate in Pseudomonas ovalis, Chester, catalysed by "pyruvate transacetase". Biochim. Biophys. Acta 42, 371-372.
GROSS, S.R. JUNGWIRTH, C. UMBARGER, E.	1962	Another intermediate in leucine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 5-9.
GROSS, S.R. BURNS, R.O. UMBARGER, H.E.	1963	The biosynthesis of leucine. II. The enzymic isomerization of ß-carboxy-ß-hydroxysocaproate. Biochemistry 2, 1046-1052.
GUYMON, J.F.	1966	Mutant strains of Saccharomyces cerevisiae applied to studies in higher alcohol formation during fermentation. Developments in Industrial Microbiology, Vol. 7, S. 88-96.
HALL, A.N. LEESON, J.A. TWEDDLE, J.C. TYDON, H.N.	1960	The degradation of some B_s-substituted tryptophans by Escherichia coli tryptophanase. Biochem. J. 74, 209-216.

HALPERN, Y.S. UMBARGER, H.E.	1959	Evidence for two distinct enzyme systems forming acetolactate in Aerobacter aerogenes. J. Biol. Chem. 234, 3067-3071.
HARDING, W.M. SHIVE, W.	1948	Biochemical transformations as determined by competetive analogue-metabolite growth inhibitions. VIII. An interelationship of methionine and leucine. J. Biol. Chem. 174, 743-756.
HORVATH, J. SZENTIRMAI, A. ZSADANYI, J.	1967	Induced phenotypic resistance to valine in Mycrobacterium pellegrino. J. Bacteriol. 94, 850-855.
IMAI, K. REEVES, H.C. AJE, S.J.	1963	n-Propylmalate synthetase. J. Biol. Chem. 238, 3193-3198.
INGRAHAM, J.L. GUYMON, J.F.	1960	The formation of higher aliphatic alcohols, by mutant strains of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys. 88, 157-166.
INGRAHAM, J.L. GUYMON, J.F. CROWELL, E.A.	1961	The pathway of formation of n-butyl and n-amyl alcohols by a mutant strain of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Biochem. Biophys. 95, 169-175.
JUNGWIRTH, C. MARGOLIN, P. UMBARGER, E. GROSS, S.R.	1961	The initial step in leucine biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 435-438.
JUNGWIRTH, C. GROSS, S.R. MARGOLIN, P. UMBARGER, H.E.	1963	The biosynthesis of leucine. I. The accumulation of ß-carboxy-ß-hydroxy isocaproate by leucine auxotrophs of Salmonella typhimurium and Neurospora crassa. Biochemistry 2, 1-6.
KARLSTRÖM, O.	1965	Methods for production of mutants suitable as amino acid fermentation organisms. Biotechn. Bioenerg. 7, 245-268.
KINOSHITA, S. NAKAYAMA, K. UDAKA, S.	1957	The fermentative production of L-ornithine. J. Gen. Appl. Microbiol. 3, 276-277.

KISUMI, M. KATO, I. CHIBATA, I.	1964	Studies on the isoleucine fermentation. III. The incorporation of D-threonine-2-^{14}C and uniformly labeled glucose-^{14}C into isoleucine. J. Biochem. 56, 450-456.
KÖNIG, C.	1967	Über die Kultur von Hydrogenomonas H 16 im Chemostaten unter chemoorganotrophen Bedingungen. Diss. Göttingen.
KOLHAW, G.B. UMBARGER, H.E.	1965	Reactions catalysed by ß-carboxy-ß-isocaproate synthetase. Federation Proc. 24, 356.
LANDY, M. LARKUM, N.W. OSWALD, E.J. STREIGHTHOFF, F.	1943	Increased synthesis of p-aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamid resistance in Staphylococcus aureus. Science 97, 265-267.
LEAVITT, R.I. UMBARGER, H.E.	1961	Isoleucine and valine metabolism in Escherichia coli. X. The enzymatic formation of acetohydroxybutyrate. J. Biol. Chem. 236, 2486-2491.
LEAVITT, R.I. UMBARGER, H.E.	1962	Isoleucine and valine metabolism in Escherichia coli. XI. Valine inhibition of the growth of Escherichia coli K 12. J. Bacteriol. 63, 624-630.
LEDERBERG, J. LEDERBERG, E.M.	1952	Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399-406.
LEVIN, A.P. HARTMANN, P.E.	1963	Mode of action of a histidine analogue, 1,2,4-triazol-alanine. Bacteriol. Proc. 22, 113.
LONCRINI, D.F.	1956	Synthesis of ω-trifluormethylamino acids. Doctoral Diss: Florida State University.
MAAS, W.K.	1961	Studies on repression of arginine biosynthesis in Escherichia coli. Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 26, 183-191.

MAAS, W.K.	1965	Genetic defects affecting an arginine permease and repression of arginine biosynthesis in Escherichia coli. Federation Proc. 24, 1239-1242.
MANDELL, J.D. GREENBERG, J.	1960	A new chemical mutagen for bacteria 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 575-577.
MARGOLIN, P.	1962	Gentic fine structure of the leucine operon in Salmonella. Genetics 48, 441-457.
MARTIN, W.R. COLEMAN, W.H. WIDBURG, N.E. CANTRELL, R. JACKSON, M. DENISON, F.W.	1962	ß-Carboxy-ß-hydroxyisocaproate formation by microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 62, 165-167.
MARTIN, R.G.	1963	The first enzyme in histidine biosynthesis: The nature of feedback inhibition by histidine. J. Biol. Chem. 238, 257-268.
MAW, G.A.	1966	Incorporation and distribution of ethionine-sulfur in the protein of ethionine-sensitive and ethionine-resistant yeasts. Arch. Biochem. Biophys. 115, 291-301.
MITCHELL, H.K. NIEMANN, C.	1947	The competetive inhibition of the metabolism of α-amino acids by their halogenated analogs. J. Am. Chem. Soc. 69, 1232.
MOYED, H.S.	1960a	False feedback inhibition: inhibition of tryptophan biosynthesis by 5-methyltryptophan. J. Biol. Chem. 238, 257-268.
MOYED, H.S.	1960b	Induced phenotypic resistance to antimetabolite. Science 131, 1449.
MOYED, H.S.	1961	Interference with the feedback control of histidine biosynthesis. J. Biol. Chem. 238, 257-268.

MOYED, H.S. 1964 Biochemical mechanisms of drug resistance. Ann. Rev. Microbiol. 18, 347-366.

MUNIER, R. COHEN, G.N. 1956 Incorporation d' analogues structuraux d' aminoacides dans les protéins bacteriennes au cours de leur synthese in vivo. Biochim. Biophys. Acta 21, 347-366.

MUNIER, R. COHEN, G.N. 1959 Incorporation d' analogues structuraux d' aminoacides dans les protéins bacteriennes au cours de leur synthese in vivo. Biochim. Biophys. Acta 31, 387-391.

NEIDHARDT, F.C. 1966 Roles of amino acid activating enzymes in cellular physiology. Bacteriol. Rev. 30, 701-719.

NESTER, E.W. COATS, J.H. 1967 Regulation reversal mutation: Characterization of endproduct activated mutants of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem. 242, 4948-4955.

NEUBAUER, O. FROMHERZ, K. 1911 Über den Abbau der Aminosäuren bei der Hefegärung. Z. physiol. Chem. 70, 326-350.

OAKBERG, E.F. LURIA, S.E. 1947 Mutations to sulfonamide resistance in Staphylococcus aureus. Genetics 32, 249-261.

PETERSON, P.J. 1967 Amino acid selection in protein biosynthesis. Biol. Rev. 42, 552-613.

RABIN, R. REEVES, H.C. AIL, S.J. 1963 ß-Ethylmalate synthetase. J. Bacteriol 88, 937-944.

PEARCE, L.E. LOUTIT, J.S. 1965 Biochemical and genetic grouping of isoleucine-valine mutants of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 89, 58-63.

PFENNIG, N. LIPPERT, K.D. 1965 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55, 245-256.

RABIN, R. SALOMON, I.I. BLEIWEIS, J.C. SAMUEL, J.A. 1968 Metabolism of ethylmalic acids by Pseudomonas aeruginosa. Biochemistry 7, 377-388.

RADHAKRISHNAN, A.N. SNELL, E.E.	1960	Biosynthesis of valine and isoleucine. II. Formation of α-acetolactate and α-aceto-α-hydroxybutyrate in Neurospora crassa and Escherichia coli. J. Biol. Chem. 235, 2316-2321.
RAMAKRISHNAN, T. ADELBERG, E.A.	1965	Regulatory mechanisms in the biosynthesis of isoleucine and valine. II. Identification of two operator genes. J. Bacteriol. 89, 654-660.
REH, M.	1967	Regulation der Synthese von Isoleucin und Valin durch Hydrogenomonas H 16. Diss. Göttingen.
REH, M.	1968	Persönl. Mitteilung
RENNERT, O.M. ANKER, H.S.	1963	On the incorporation of 5',5',5'-trifluorleucine into proteins of Escherichia coli. Biochemistry 2, 471-476.
RENNERT, O.M. ANKER, H.S.	1964	Effect of 5',5',5'-trifluorleucine on a number of mouse leucaemias. Nature 203, 1256-1257.
RICHMOND, M.H.	1960	Immunological properties of exopenicillinase synthesized by Bacillus cereus 569/H in the presence of amino acid analogues. Biochem. J. 77, 112-121.
RICHMOND, M.H.	1962	The effect of amino acid analogues on growth and protein synthesis in microorganisms. Bacteriol. Rev. 26, 398-420.
ROBERTS, R. COWIE, D.B. ABELSON, T.H. BOLTON, E.T. BRITTEN, R.J.	1955	in: Studies of biosynthesis in Escherichia coli. Carnegie Institution of Washington Publication N. 607, Washington D.C.
ROBERTS, E. ROUSER, G.	1958	Spectrophotometric assay for reaction of N-ethylmaleimid with sulfhydryl groups. Anal. Chem. 30, 1291-1294.
ROSEN, H.	1957	A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. Biochem.Biophys. 67, 10-15.

RUDMAN, D.
MEISTER, A.
1953
Transamination in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 200, 591-604.

SCHERR, G.H.
RAFELSON, M.E.
1962
The directed isolation of mutants producing an increased amounts of metabolites.
J. Appl. Bacteriol. 25, 187-194.

SCHERR, G.H.
RAFELSON, M.E.
1963a
Method of increasing metabolic product yield of organism.
U.S. Pat. 3,071,518.

SCHERR, G.H.
RAFELSON, M.E.
1963b
The direct isolation of mutants having increased yields of fermentation products.
Developments in Industrial Microbiology Vol. 4, 245-252.

SCHERR, G.H.
RAFELSON, M.E.
1966
Antimetabolites as selective agents for the isolation of biochemical mutants.
Developments in Industrial Microbiology Vol. 7, 97-103.

SCHINDLER,
1964
Die Synthese von Poly-ß-hydroxybuttersäure durch Hydrogenomonas H 16: Die zum ß-Hydroxybutyryl-coenzym A führenden Reaktionsschritte.
Arch. Mikrobiol. 49, 236-255.

SCHLEGEL, H.G.
KALTWASSER, H.
GOTTSCHALK, G.
1961
Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxydierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen.
Arch. Mikrobiol. 49, 209-222.

SCHLEGEL, H.G.
1961
Formation and utilisation of poly-ß-hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (Hydrogenomonas).
Nature 191, 463-465.

SCHLEGEL, H.G.
SCHUSTER, E.
REH, M.
METZ, H.
1965
Die Abtötung wachsender Hydrogenomonas-Zellen durch Colistin.
Zbl. Bakt. II 119, 225-231.

SCHLESINGER, S.
MAGASANIK, B.
1964
Effect of α-methylhistidine on the control of histidine biosynthesis.
J. Mol. Biol. 9, 670-682.

SCHMIDT, K. JENSEN, S.L. SCHLEGEL, H.G.	1963	Die Carotinoide der Thiorhodacea. I. Okenon als Hauptcarotinoid von Chromatium okenii Perty. Arch. Mikrobiol. 46, 117-126.
SCHUSTER, E.	1967	Chemolithotrophes Wachstum von Hydrogenomonas H 16 im Chemostaten mit elektrolytischer Knallgaserzeugung. Diss. Göttingen.
SCHWARTZ, J.H. MAAS, W.K. SIMON, E.J.	1959	An impaired concentrating mechanism for amino acids in mutants of Escherichia coli resistant to L-canavanine and D-serine. Biochim. Biophys. Acta 32, 582-583.
SHEPPARD, D.E. HARTMANN, P.E.	1963	Feedback resistant mutants in the histidine biosynthesis pathway of Salmonella typhimurium. Federation Proc. 22, 475.
SHIOTA, T. FOLK, J.E. TIETZE, F.	1958	Inhibition of lysine utilisation in bacteria by S-(ß-aminoethyl) cysteine and its reversal by lysine peptides. Arch. Biochem. Biophys. 77, 372-377.
STAHL, E.	1962	Dünnschichtchromatographie. Berlin
STRASSMAN, M. THOMAS, A.J. WEINHOUSE, S.	1955a	The biosynthesis of valine. J. Am. Chem. Soc. 77, 1261-1265.
STRASSMAN, M. LOCKE, L.A. THOMAS, A.J. WEINHOUSE, S.	1955b	A study of leucine biosynthesis in Torulopsis utilis. Science 121, 303-304.
STRASSMAN, M. LOCKE, L.A. THOMAS, A.J. WEINHOUSE, S.	1956	A study of leucine biosynthesis in Torulopsis utilis. J. Am. Chem. Soc. 78, 1599-1602.
STRASSMAN, M. CECI, L.N.	1963	Enzymatic formation of α-isopropylmalic acid, an intermediate in leucine biosynthesis. J. Biol. Chem. 238, 2445-2453.
STRASSMAN, M. CECI, L.N. SILVERMAN, B.E.	1964	Acetyl CoA condensation with α-keto acids. Federation Proc. 23, 312.

TAYLOR, R.T.
JENKINS, W.T. 1966 Leucine aminotransferase.
I. Colorimetric assays.
J. Biol. Chem. 241, 4391-4395.

UDAKA, S.
KINOSHITA, S. 1960 The fermentative production of L-valine by bacteria.
J. Gen. Appl. Microbiol. 5, 159-174.

UMBARGER, H.E.
BROWN, B. 1958 Isoleucine and valine metabolism in Escherichia coli. VIII. The formation of acetolactate.
J. Biol. Chem. 233, 1156-1160.

UMBARGER, H.E.
SIU, P.L.M.
CALVO, J.M.
FREUNDLICH, M. 1965 The end product sensitive enzymes in the pathway of the branched chain amino acids and serine.
Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris) 124, 271-282.

UNGER, L.
DeMOSS, R.D. 1966 Action of proline analogue, L-thiazolidine-4-carbolic acid, in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 91, 1556-1570.

VARGA, J.M.
HORVATH, J. 1967 Role of acetohydroxy acid synthetase in the regulation of valine and isoleucine biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa.
Acta Biochem. et Biophys. Acad. Sci. Hung. Vol. 2, 357-369.

VOGT, M. 1964 Wachstumsphysiologische Untersuchungen an Micrococcus denitrificans Beij.
Diss. Göttingen.

WALBORSKY, H.M. 1955 The synthesis of ω-trifluoromethyl amino acids.
II. Their microbiological activities.
J. Am. Chem. Soc. 77, 3637-3640.

WALBORSKY, H.M.
LANG, J.H. 1956 Effects of the trifluormethyl group.
IV. The pK's of ω-trifluoroamino acids.
J. Am. Chem. Soc. 78, 4314-4316.

WEBB, A.D.
INGRAHAM, J.L. 1963 Fusel oil.
Advanc. Appl. Microbiol. 5, 317-353.

WEBSTER, R.E. GROSS, S.R. 1965 The α-isopropylmalate synthetase of Neurospora. I. The kinetics and endproduct control of α-isopropylmalate synthetase function. Biochemistry 4, 2309-2318.

WESTERFELD, W.W. 1945 A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem. 161, 495-502.

WILDE, E. 1961 Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von Hydrogenomonas. Diss. Göttingen.

WOODS, D.D. 1940 The relation of p-amino benzoic acid to the mechanism of action of sulphanilamide. Brit. J. Exptl. Pathol. 21, 74-90.

ZAMENHOFF, S. EICHHORN, H.H. 1967 Study of microbial evolution through loss of biosynthetic functions: Establishment of "defective" mutants. Nature 216, 456-458.

Herrn Prof. Dr. H.G. Schlegel danke ich für die Überlassung des Themas, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine stets gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 25.7.1943 wurde ich als Sohn des Landwirts Fritz Hill und seiner Ehefrau Herta geb. Hube in Königsberg i. Ostpr. geboren. Vom Frühjahr 1949 besuchte ich die Volksschule Auen (bei Lindern, Krs. Cloppenburg). Nach dem Umzug meiner Eltern nach Rastede, Krs. Ammerland, besuchte ich ab 1953 die Volksschule Rastede. 1955 wechselte ich zum Aufbaugymnasium (Graf-Anton-Günther-Schule) in Oldenburg über. Im Frühjahr 1962 legte ich die Reifeprüfung im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Schule ab. Im Sommersemester desselben Jahres immatrikulierte ich mich zum Studium der Naturwissenschaften an der Georg-August-Universität Göttingen. Seit dem Sommersemester 1966 arbeite ich im Institut für Mikrobiologie der Universität an der vorliegenden Dissertation.

Bönecke-Druck - Clausthal-Zellerfeld 29